

# **Untersuchungen zur Eignung viraler Vollängenklone zur Expression von Nukleinsäuresequenzen mit möglichem antiviralem Potential in Pflanzen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Ulrike Harr  
aus Bielefeld

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Hehl

2. Referent: Prof. Dr. Edgar Maiß

eingereicht am: 07. Mai 2002

mündliche Prüfung (Disputation) am: 09. August 2002

Druckjahr: 2002

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Tagungsbeiträge**

Harr, U., Koenig, R., Lesemann, D.-E. and Santa Cruz, S.: Expression of native and modified genes in plants from infectious viral cDNA clones. (Vortrag) Gemeinsame Tagung des DPG-Arbeitskreises „Viruskrankheiten der Pflanzen“ und des Arbeitskreises „Nederlandse Kring voor Plantevirologie“, Köln (2001).

# Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1. Möglichkeiten zur Bekämpfung von Virusinfektionen bei Pflanzen</b>	<b>1</b>
1.1. Natürliche Virusresistenz in Pflanzen	1
1.2. Virusresistenz durch <i>Cross-protection</i> und Pathogen-vermittelte Resistenzen	2
1.3. Pathogen-vermittelte Virusresistenzen in transgenen Pflanzen	3
1.3.1. Protein-vermittelte Resistenzen	4
1.3.2. RNA-vermittelte Resistenzen	6
1.3.3. Resistenzen durch nicht-virale Sequenzen	8
<b>2. Virale Vollängenklone</b>	<b>10</b>
2.1. Strategien zur Expression von Fremdsequenzen über virale Vollängenklone	11
2.2. Anwendungsmöglichkeiten viraler Vollängenklone	14
<b>3. Das Genom des <i>Potato virus X</i> als Quelle für Sequenzen mit antiviralem Potential</b>	<b>15</b>
3.1. Organisation des PVX-Genoms	15
3.2. Die verschiedenen Komponenten des PVX- <i>Triple gene blocks</i> und ihre Funktionen	16
3.3. Durch die verschiedenen Komponenten des PVX-Genoms vermittelte Resistenzen	17
3.3.1. Durch das Replikations-assoziierte Protein P166 vermittelte Resistenzen	17
3.3.2. Durch die Komponenten des <i>Triple gene blocks</i> vermittelte Resistenzen	18
3.3.3. Durch das PVX-Hüllprotein vermittelte Resistenzen	18
<b>4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>B. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>1. Allgemeines Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>20</b>
<b>2. Material</b>	<b>23</b>
2.1. Chemikalien und Biochemikalien	23
2.2. Kits	23
2.3. Enzyme	23
2.4. Größenstandards	24
2.5. Synthetische Oligonukleotide	24
2.5.1. Synthetische Oligonukleotide allgemein	24
2.5.2. CIYVV-Hüllproteingen-spezifische Oligonukleotide	24
2.5.3. CymMV-spezifische Oligonukleotide	25
2.5.4. GFP-spezifische Oligonukleotide	25
2.5.5. PVX-spezifische Oligonukleotide	26
2.5.6. PVY-spezifische Oligonukleotide	28
2.5.7. TEV-spezifische Oligonukleotide	29
2.5.8. TRV-spezifische Oligonukleotide	31
2.6. Plasmide	32
2.6.1. Klonierungs- und Expressionsvektoren	32
2.6.2. Infektiöse virale cDNA-Klone	33
2.7. Bakterienstämme	36
2.8. Virus-Isolate	36
2.8.1. <i>Potato virus Y</i> (PVY)	36
2.8.2. <i>Tobacco rattle virus</i> (TRV)	36

2.9.	Immunglobuline	37
2.10.	Pflanzenmaterial	37
2.11.	Nährmedien und Antibiotika	37
2.11.1.	Allgemeine Medien zur Kultivierung von Bakterien	37
2.11.2.	Stammlösungen Antibiotika	38
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>38</b>
3.1.	Molekularbiologische Grundtechniken	38
3.1.1.	Sterilisationsverfahren	38
3.1.2.	Kultivierung von Bakterien	38
3.1.3.	Alkoholpräzipitation von DNA	38
3.1.4.	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	39
3.1.5.	Agarosegelelektrophorese	39
3.1.6.	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
3.1.7.	Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen	40
3.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
3.2.1.	Präparative Anwendung der PCR	41
3.2.2.	Analytische Anwendung der PCR	42
3.2.3.	Gerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR	42
3.3.	DNA-Klonierung	44
3.3.1.	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	44
3.3.2.	Ligationsreaktion	44
3.3.3.	Dephosphorylierung von Vektoren	44
3.3.4.	Transformation von DNA in <i>E.coli</i>	45
3.3.5.	Transformation von DNA in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
3.3.6.	Präparation von Plasmid-DNA	46
3.4.	Expression viraler Hüllproteine in <i>Escherichia coli</i>	47
3.4.1.	Expression von viralen Hüllproteinen in BL 21 (DE3)	47
3.4.2.	Probenvorbereitung für den Nachweis der exprimierten Hüllproteine in der Western-Analyse	47
3.4.3.	Aufreinigung von virusähnlichen Partikeln (VLPs)	48
3.5.	Übertragung von Viren auf Pflanzen	48
3.5.1.	Erhaltung und Vermehrung von Viren	48
3.5.2.	Infektion von Pflanzen mit viralen cDNA-Klonen	48
3.6.	Extraktion von Gesamt-Protein aus virusinfizierten Pflanzen	50
3.7.	Allgemeine serologische Methoden	50
3.7.1.	Gewinnung von Immunglobulinen	50
3.7.2.	Herstellung von Antikörper-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugaten	51
3.7.3.	<i>Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay</i>	51
3.7.4.	Herstellung viraler cDNAs	52
3.7.5.	Immunelektronenmikroskopische Detektion von Viruspartikeln: <i>Immunosorbent electron microscopy</i> (ISEM) und Dekorationstest	53
3.7.6.	Nachweis viraler Hüllproteine durch Western-Analyse	54
3.7.7.	Affinitätsreinigung von spezifisch gebundenen Antikörpern	56
3.8.	Transformation mit Hilfe der Partikelkanone	57
3.8.1.	Vorbereitung des Blattmaterials	57
3.8.2.	Vorbereitung der Partikel	58
3.8.3.	Beschichtung der Partikel und Präparation der Flugscheiben	58
3.8.4.	Partikelbeschuß	58
3.9.	Fluoreszenzmikroskopie	58
3.10.	Agroinfektion	59
3.11.	Extraktion von Gesamt-DNA aus agroinfizierten Pflanzen	60

<b>C. Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>1. Entwicklung eines für die Expression von Fremdgenen geeigneten viralen Vektorsystems</b>	<b>61</b>
1.1. Entwicklung eines viralen Vektorsystems auf der Basis der <i>Tobacco rattle virus</i> RNA1 und RNA2	61
1.2. Entwicklung eines viralen Vektorsystems auf der Basis bereits vorhandener Vollängklone verschiedener Viren	62
1.2.1. Einführung einer Ascl-Restriktionsschnittstelle in die zu testenden viralen cDNA-Klone	62
1.2.2. Insertion der GFP-Gensequenz in die verschiedenen viralen cDNA-Klone	65
1.2.3. Bestimmung der Infektionsrate der verschiedenen viralen cDNA-Klone	65
1.2.4. Stabilität des Inserts	66
1.2.5. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der GFP-Expression	68
<b>2. Expression von Fremdsequenzen mit möglichem antiviralem Potential über pPVX P2A Ascl</b>	<b>70</b>
2.1. Untersuchung des antiviralen Potentials verschiedener Bereiche des PVX-Genoms	70
2.1.1. Expression verschiedener Teilbereiche des P166	70
2.1.2. Expression der verschiedenen Komponenten des <i>Triple gene blocks</i>	73
2.1.3. Expression verschiedener Teilbereiche des <i>Triple gene block</i> -Proteins P8	77
2.1.4. Untersuchung der Beeinflussung des Zell-zu-Zell-Transports des PVX durch transiente Expression verschieden verkürzter Teilstücke des <i>Triple gene block</i> -Proteins P8	82
2.1.5. Untersuchung einer möglichen Autotoxizität verschiedener Teilstücke des P8-Proteins aus PVX	90
2.1.6. Inokulation agroinfizierter <i>Datura stramonium</i> -Pflanzen mit pPVX P2A ATG	92
2.1.7. Expression des dritten <i>Triple gene block</i> -Proteins aus dem Potexvirus <i>Cymbidium mosaic virus</i> (CymMV)	93
2.1.8. Expression des PVX-Hüllproteins	95
2.2. Untersuchung des antiviralen Potentials von Hüllproteingenen verschiedener Viren	96
<b>3. Expression von Hüllproteinen verschiedener Viren als Sequenzen mit möglichem antiviralem Potential über pTEV H/C Ascl</b>	<b>97</b>
<b>4. Untersuchung der Bildung von virusähnlichen Partikeln durch über virale Vollängklone exprimierte Hüllproteine verschiedener Viren</b>	<b>98</b>
4.1. Untersuchung der Bildung virusähnlicher Partikel durch über pPVX P2A Ascl exprimierte Hüllproteine verschiedener Viren	98
4.2. Bildung virusähnlicher Partikel durch verkürzte und veränderte Hüllproteine verschiedener Viren im pPVX P2A-System	101
4.2.1. Bildung virusähnlicher Partikel durch verschieden verkürzte und veränderte Sequenzen des TRV ON-Hüllproteins	101
4.2.1.1. Virusnachweis im ELISA und immunoelektronenmikroskopische Untersuchung	103
4.2.1.2. Western-Analyse der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten TRV ON-Hüllproteinsequenzen	105
4.2.1.3. Expression von TRV ON-Hüllprotein in <i>E.coli</i>	107
4.2.2. Bildung virusähnlicher Partikel durch verkürzte Sequenzen des TRV ORY-Hüllproteins	112
4.2.2.1. Virusnachweis im ELISA und immunoelektronenmikroskopische Untersuchung	112
4.2.2.2. Western-Analyse der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten TRV ORY-Hüllproteinsequenzen	113

4.2.3.	Bildung virusähnlicher Partikel durch verschieden verkürzte Sequenzen des PVY-Hüllproteins	114
4.2.3.1.	Virusnachweis im ELISA und immunelektronenmikroskopische Untersuchung	116
4.2.3.2.	Western-Analyse der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten PVY-Hüllproteinsequenzen	118
4.2.3.3.	Expression von PVY-Hüllprotein in <i>E. coli</i>	119
4.2.4.	Bildung virusähnlicher Partikel durch verschieden verkürzte Sequenzen des TEV-Hüllproteins	121
4.2.4.1.	Virusnachweis im ELISA und immunelektronenmikroskopische Untersuchung	122
4.2.4.2.	Western-Analyse der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten TEV-Hüllproteinsequenzen	124
4.2.4.3.	Expression von TEV-Hüllprotein in <i>E. coli</i>	125
4.3.	Untersuchung der Bildung virusähnlicher Partikel durch über pTEV H/C Ascl exprimierte Hüllproteine verschiedener Viren	127
4.3.1.	Western-Analyse der über pTEV H/C Ascl exprimierten Hüllproteine verschiedener Viren	128
4.3.2.	Einfluß zusätzlicher N- und C-terminaler Sequenzen auf die Fähigkeit des TRV ON-Hüllproteins zur Bildung von virusähnlichen Partikeln	129
<b>D.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>131</b>
<b>1.</b>	<b>Schwierigkeiten bei der Herstellung infektiöser Vollängklone der Tobacco rattle virus RNA1 und RNA2</b>	<b>132</b>
<b>2.</b>	<b>Gewinnung eines für die Expression von Nukleinsäuresequenzen geeigneten viralen Vektorsystems</b>	<b>132</b>
2.1.	Beurteilung der Infektionsraten der verschiedenen viralen cDNA-Klone	133
2.2.	Beurteilung der Stabilität des Inserts	133
2.3.	Beurteilung der Effizienz der Fremdgenexpression	134
<b>3.</b>	<b>Versuche zur Nutzung viraler Vollängklone in Doppelinfektionsversuchen als Basis für ein heterologes Testsystem</b>	<b>135</b>
<b>4.</b>	<b>Ermittlung des antiviralen Potentials von verschiedenen Bereichen des PVX-Genoms in einem homologen Testsystem</b>	<b>135</b>
4.1.	Teilbereiche des Replikations-assoziierten Proteins P166	136
4.2.	Die Komponenten des <i>Triple gene blocks</i>	136
4.2.1.	Das erste <i>Triple gene block</i> -Protein (P25)	136
4.2.2.	Das zweite <i>Triple gene block</i> -Protein (P12)	138
4.2.3.	Das dritte <i>Triple gene block</i> -Protein (P8)	139
<b>5.</b>	<b>Ermittlung des antiviralen Potentials von viralen Hüllproteingenen in einem homologen Testsystem</b>	<b>141</b>
<b>6.</b>	<b>Bildung von virusähnlichen Partikeln durch über virale Vollängklone exprimierte Hüllproteine verschiedener Viren</b>	<b>144</b>
<b>7.</b>	<b>Bildung von virusähnlichen Partikeln durch veränderte Hüllproteine verschiedener Tobra- und Potyviren über pPVX P2A Ascl</b>	<b>146</b>
7.1.	Bildung von virusähnlichen Partikeln durch verschieden verkürzte und veränderte Hüllproteine der Tobraviren TRV ON und TRV ORY	146
7.1.1.	Analyse der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse über für die Partikelbildung essentielle Bereiche des TRV-Hüllproteins	147
7.1.2.	Absicherung der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse über für die Partikelbildung essentielle Bereiche des TRV ON-Hüllproteins	150
7.2.	Bildung von virusähnlichen Partikeln durch verschieden verkürzte Hüllproteine der Potyviren PVY und TEV	151

7.2.1. Analyse der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung N- und C-terminaler Bereiche des PVY- bzw. des TEV-Hüllproteins für die Partikelbildung	152
7.2.2. Bewertung der Verlässlichkeit der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung N- und C-terminaler Bereiche des PVY- bzw. des TEV-Hüllproteins für die Partikelbildung	154
7.3. Beurteilung der Zusammensetzung der durch exprimierte Hüllproteine gebildeten virusähnlichen Partikel	155
<b>8. Vor- und Nachteile von viralen Vollängenklonen als Expressionssysteme</b>	<b>156</b>
<b>E. Zusammenfassung</b>	<b>160</b>
<b>F. Literatur</b>	<b>163</b>



## A. Einleitung

### 1. Möglichkeiten zur Bekämpfung von Virusinfektionen bei Pflanzen

Durch Pflanzenviren verursachte Infektionen führen jedes Jahr zu erheblichen Ertrags- und Qualitätseinbußen in nahezu allen wirtschaftlich bedeutenden Pflanzenarten. Virusinfektionen stellen für die Landwirtschaft ein besonderes Problem dar, da sich der Virusbefall selbst - im Gegensatz zu einem Befall mit anderen Pathogenen - durch chemische Agentien weder verhindern noch einschränken läßt. Eine chemische Bekämpfung ist höchstens indirekt durch den Einsatz von Pestiziden möglich, die sich auf die für die Übertragung einiger Viren notwendigen Vektoren - meist Insekten, Nematoden oder Pilze - auswirken. Weitere Möglichkeiten zur Verhinderung von Virusinfektionen sind pflanzenhygienische Maßnahmen wie die ausschließliche Verwendung von zertifiziertem, virusfreiem Pflanzenmaterial, die sofortige Vernichtung von infizierten Pflanzen, die Beseitigung von Wildkräutern und Wildformen von Nutzpflanzen als möglichen Infektionsquellen oder ein regelmäßiger Fruchtwechsel auf den genutzten Feldern. Die effektivste Möglichkeit, Pflanzen vor Virusinfektionen zu schützen, ist allerdings der Anbau von virusresistenten Sorten.

#### 1.1. Natürliche Virusresistenz in Pflanzen

Die meisten Pflanzenarten weisen eine natürliche Unempfindlichkeit gegenüber einem Großteil der bis heute bekannten Pflanzenviren auf. Diese passive Form der Resistenz geht zumeist auf Inkompatibilitäten zwischen potentieller Wirtspflanze und Virus zurück, d.h. die Pflanze bietet dem Virus nicht die Voraussetzungen, die es für eine erfolgreiche Infektion benötigt. Diese Inkompatibilität kann auf der Ebene der Transmission, der Replikation oder des Transports erfolgen.

Dem gegenüber steht ein aktiver Prozeß, in dem sich die Pflanze durch die Produktion von Resistenz-Faktoren aktiv vor einer Virusinfektion zu schützen versucht. Das wichtigste Beispiel für diese Art von natürlicher Resistenz ist die Hypersensitivitätsreaktion (HR: *hypersensitive response*). Dieses Phänomen beruht auf einer einfachen Gen-zu-Gen-Interaktion (Flor, 1971; Keen, 1990). Dies bedeutet, daß eine Abwehrreaktion nur dann erfolgt, wenn das Pathogen ein stammspezifisches Avirulenz (avr)-Gen trägt, welches mit einem entsprechenden pflanzeigenen Resistenz (R)-Gen korrespondieren kann. Durch Interaktion der durch diese beiden Gene enkodierten Produkte wird ein programmierter Zelltod (Apoptose) eingeleitet, der zu einem lokalen Absterben der Zellen im Bereich der Erstinfektion führt (Mittler et al., 1997; Morel and Dangl, 1997). Darüberhinaus wird in der gesamten Pflanze durch die Produktion spezifischer Signale, wie PR (*pathogenesis related*)-Proteine, Salicylsäure oder reaktive Sauerstoffverbindungen, ein allgemeiner Verteidigungsmechanismus ausgelöst (Dangl et al., 1996; Hammond-Kosack and Jones, 1996; Ryals et al., 1996), der schließlich zu einer unspezifischen Resistenz auch in der gesamten Pflanze führt (SAR: *systemic acquired resistance*; Ryals et al., 1996).

Eines der am besten untersuchten Beispiele für eine aktive Pathogenabwehr ist die Interaktion zwischen *Potato virus X* (PVX) und spezifischen R-Genen aus Kartoffel (Baulcombe et al., 1994). Zwei verschiedene Gruppen von R-Genen konnten bisher in der Kartoffel identifiziert werden (Cockerham, 1970). Zum einen die HR auslösenden Gene Nb und Nx und zum anderen die Gene Rx1 und Rx2, die nach einem bisher noch nicht näher bezeichneten Mechanismus eine extreme Resistenz gegenüber PVX erzeugen können. Korrespondierende Avirulenz-Determinanten konnten für die R-Gene

Nx und Rx innerhalb des PVX-Hüllproteingens identifiziert werden (Kavanagh et al., 1992; Santa Cruz and Baulcombe, 1993), während für die Nb-vermittelte Abwehr bestimmte Bereiche des PVX-Transportproteins P25 verantwortlich zu sein scheinen (Malcuit et al., 1999). Der Aspekt, daß diese Art von natürlicher Resistenz meist auf ein einziges, pflanzeigenes Gen zurückzuführen ist, machte diese Form von Pathogenabwehr für züchterische Zwecke sehr attraktiv.

Durch gezielte Kreuzung resistenter Pflanzen mit ertragreichen, aber nicht resistenten Sorten können diese natürlichen Resistenzen auf wirtschaftlich wichtige Pflanzensorten übertragen werden. Obwohl die bisher effektivste Art der Pathogenabwehr ist die Züchtung virusresistenter Pflanzen ein langwieriger und damit kostenintensiver Prozeß. Zudem kann die mühsam eingebrachte Resistenz durch die Entstehung von resistenzbrechenden Virusmutanten unwirksam werden. Letztlich sind nicht in allen wirtschaftlich genutzten Pflanzenarten einschließlich ihrer Wildformen Resistenzgene gegenüber den sie am meisten schädigenden Viren vorhanden.

## 1.2. Virusresistenz durch *Cross-protection* und Pathogen-vermittelte Resistenzen

Eine einfache Form der Pathogenbekämpfung entwickelte sich aus Beobachtungen, die im Jahre 1929 anhand von Tabakpflanzen auf den Kanarischen Inseln gemacht werden konnten. H.H. McKinney entdeckte, daß Pflanzen, die bereits mit einem sehr milden Stamm des *Tobacco mosaic virus* (TMV) infiziert waren, einer Infektion durch einen heftigere Symptome verursachenden Stamm der gleichen Virusspecies widerstehen konnten. Dieses als ‚*Cross-protection*‘ (Prämunität) bezeichnete Phänomen konnte inzwischen für eine Reihe anderer Viren gezeigt werden (Fulton et al, 1986) und wurde lange Jahre weltweit genutzt, um Virusinfektionen bei wirtschaftlich wichtigen Pflanzen wie z.B. Tomate, Papaya und Zitrusfrüchten einzudämmen (Beachy et al., 1990; Gadani et al., 1990; Hull and Davies, 1992). Eine praktische Anwendung dieser Methode ist allerdings mit einer Reihe von Problemen verbunden. Obwohl die Pflanze die milde Infektion mit dem protektierenden Virus toleriert, kann es dennoch zu nicht unerheblichen Ertragsverlusten kommen. Darüberhinaus können bei Infektion mit einem zweiten Virus synergistische Effekte auftreten, die nicht zu einer Abschwächung, sondern zu einer Verstärkung des Symptombildes und damit zu erhöhten Verlusten führen. Ein weiteres Problem ergibt sich daraus, daß Virusstämme sich häufig in ihrer Virulenz gegenüber verschiedenen Nutzpflanzen oder sogar gegenüber verschiedenen Sorten einer Nutzpflanzenart stark unterscheiden. Ein Virus, das in der einen Pflanzensorte zur Protektion verwendet wird, kann in benachbart wachsenden Pflanzen oder in der im nachfolgenden Jahr angebauten Sorte extreme Schäden verursachen. Schließlich besteht die Möglichkeit, daß aufgrund des häufigen Auftretens von Mutationen während der Replikation der viralen RNA aggressivere Virusmutanten entstehen, die nachträglich schwere Infektionen in den mit dem ursprünglich milden Virusstamm infizierten Pflanzen hervorrufen.

Trotz intensiver Forschung konnten die molekularen Mechanismen der *Cross-protection* bis heute nicht vollständig geklärt werden. Zahlreiche Hypothesen versuchen eine Erklärung für die beobachteten Phänomene zu liefern, darunter Annahmen wie (1) die RNA des schützenden Virus hybridisiert mit der entstehenden Minusstrang-RNA des zweiten Virus, (2) das Hüllprotein des schützenden Virus verhindert die Dekapsidierung der RNA des zweiten Virus, (3) die Anwesenheit des schützenden Virus unterbindet die systemische Ausbreitung des zweiten Virus oder (4) die Replikation des schützenden Virus aktiviert einen wirtseigenen Abwehrmechanismus, der zur Degradation der RNA

des zweiten Virus führt (Angell and Baulcombe, 1997; Dodds et al., 1985; Palukaitis and Zaitlin, 1984; Ponz and Bruening, 1986; Sherwood, 1987; Sherwood and Fulton, 1982).

Allen Hypothesen gemein ist allerdings die Annahme, daß viralen Komponenten selbst die Schlüsselfunktion bei der Auslösung dieses Prozesses zukommt. Ausgehend von diesen Erkenntnissen postulierte Hamilton in Jahre 1980 erstmals, daß eine der *Cross-protection* ähnliche Resistenz erzeugt werden könnte, indem Teile des viralen Genoms in die zu schützende Pflanze übertragen werden würden. Diese Idee wurde einige Jahre später von Sanford and Johnston (1985) aufgegriffen und zu einem generellen Konzept - der pathogen-vermittelten Resistenz - ausgearbeitet. Dieses Konzept basiert auf der Annahme, daß sich die Expression bestimmter Gene eines Pathogens - sprich eines Virus - in einer Wirtspflanze störend auf die für den Ablauf einer normaler Infektion notwendige Balance zwischen verschiedenen viralen Komponenten und wirtseigenen Faktoren auswirkt und den natürlichen Vermehrungszyklus des Virus negativ beeinflusst. Im günstigsten Fall würde eine solche Störung zu einer Inhibierung der Replikation und/oder der Ausbreitung des Virus über die erstinfizierte Zelle hinaus führen, wodurch eine nahezu vollständige Resistenz (Immunität) gegenüber dem Pathogen erreicht werden könnte.

### **1.3. Pathogen-vermittelte Virusresistenzen in transgenen Pflanzen**

Die erste praktische Bestätigung dieser Theorie lieferten Powell-Abel et al. (1986): Durch Expression des Hüllproteingens des TMV in transgenen Tabakpflanzen konnte eine hochgradige Resistenz gegenüber TMV erzeugt werden, die von einer verzögerten Symptombildung bis hin zu vollständiger Symptommfreiheit reichte. Seither konnte dieses als Hüllprotein-vermittelte Resistenz bezeichnete Phänomen für Vertreter aus mehr als 13 verschiedenen taxonomischen Gruppen nicht nur in dicotylen, sondern auch in monocotylen Pflanzen nachgewiesen werden (Hull and Davies, 1992; Lomonossoff, 1995). Aber auch andere Sequenzen viralen Ursprungs haben sich inzwischen als geeignet für die Erzeugung von Virusresistenzen und -toleranzen in transgenen Pflanzen erwiesen. Dazu zählen u.a. virale Komponenten wie Transportproteine (Ares et al., 1998; Beck et al., 1994; Seppänen et al., 1997; Tacke et al., 1996), Replikasen (Audy et al., 1994; Brederode et al., 1995; Jones et al., 1998; Rubino and Russo, 1995), Proteasen (Vardi et al., 1993; Maiti et al., 1993) oder auch Helikasen (Wittner et al., 1998). Häufig zeigte es sich sogar, daß die durch diese Sequenzen vermittelten Hemmeffekte nicht nur im homologen, sondern auch im heterologen System wirksam werden konnten; daß eine Resistenz folglich nicht nur gegenüber dem Virus zu beobachten war, aus dem die Sequenz stammt, sondern auch gegenüber mehr oder minder weit entfernten Verwandten dieses Virus.

Die Suche nach möglichen Erklärungen für die durch verschiedenste virale Sequenzen ausgelösten Resistenzen führte allerdings zu der Erkenntnis, daß hier kein allgemeingültiger Mechanismus zugrundeliegen kann. Dazu erwiesen sich die in verschiedenen Fällen beobachteten Phänomene als zu unterschiedlich und teilweise auch als widersprüchlich.

Im großen und ganzen lassen sich daher die bis heute bekannten Resistenzen zwei verschiedenen Gruppen zuordnen: Die erste Gruppe beinhaltet Resistenzen, die durch das auf das Transgen zurückgehende Protein vermittelt werden, während in der anderen Resistenzen, die auf die Wirkung der vom Transgen abstammenden RNA zurückzuführen sind, zusammengefasst werden.

### 1.3.1. Protein-vermittelte Resistenzen

Eine Protein-vermittelte Resistenz basiert auf der Fähigkeit des vom Transgen abgeleiteten Proteins mit wichtigen Funktionen innerhalb des Infektionszyklus zu interferieren. Ein Beispiel für eine solche Protein-vermittelte Resistenz ist die zuvor erwähnte, durch das TMV-Hüllprotein ausgelöste Resistenz. So deuten charakteristische Eigenschaften dieser Resistenz, wie z.B. die Beobachtung, daß ein resistenter Phänotyp nur dann zu verzeichnen ist, wenn das vom Transgen encodierte Hüllprotein in der Pflanze auch exprimiert wird oder die Beobachtung, daß die Ausprägung der Resistenz direkt mit der in der transgenen Pflanze vorhandenen Menge an TMV-Hüllprotein korreliert, darauf hin, daß in diesem Fall das Protein selbst der Auslöser der Resistenz ist. Einen möglichen Hinweis auf den dahinterstehenden Wirkmechanismus liefert die Beobachtung, daß die Resistenz lediglich bei Verwendung von Viruspartikeln, nicht aber von reiner viraler RNA als Inokulum wirksam wird. Dies läßt vermuten, daß die Resistenzwirkung des TMV-Hüllproteins auf einer Inhibition der Entpackung der viralen RNA in der erstinfizierten Zelle beruht. Dieser erstmals von Register and Beachy (1988) vorgeschlagene Mechanismus konnte inzwischen durch zahlreiche Experimente bestätigt werden (Clark et al., 1995a und b; Bendahmane et al., 1997; Osbourn et al., 1989; Reimann-Philipp and Beachy, 1993; Wu et al., 1990).

Eine ähnliche Wirkungsweise wird auch für Hüllproteine des *Tobacco rattle virus* (TRV) (Angenent et al., 1990; van Dun and Bol, 1988), des *Alfalfa mosaic virus* (AIMV) (Loesch-Fries et al., 1987), des *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Cuozzo et al., 1987) und des *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Kunik et al., 1994) angenommen.

Neben der Beeinflussung der Disassemblierung in der erstinfizierten Zelle sind allerdings auch andere Wirkungsweisen zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion denkbar. So konnten Wisniewski et al. (1990) durch Pfropfexperimente mit virusresistenten transgenen Pflanzen und virusanfälligen nicht-transgenen Pflanzen zeigen, daß das vom Transgen abgeleitete TMV-Hüllprotein auch eine Inhibition des vaskulären Transports bewirken kann. Da der Transport des TMV über das vaskuläre System ebenfalls mit Assemblierungs- und Disassemblierungsvorgängen verbunden sein könnte (Saito et al., 1990), kann nicht ausgeschlossen werden, daß dieses Phänomen lediglich eine weitere Konsequenz der Inhibierung des Disassemblierungsprozesses ist.

Die Beobachtung, daß in manchen Fällen zwar Hüllprotein für die Entwicklung eines resistenten Phänotyps dringend erforderlich ist, es aber nicht nur bei Verwendung von Viruspartikeln, sondern auch von viraler RNA als Inokulum zu einer Ausprägung der Resistenz kommt, deutet ebenfalls auf weitere Mechanismen hin, nach denen eine Hüllprotein-vermittelte Resistenz erfolgen kann. Beispiele hierfür sind durch die Hüllproteine des AIMV und des PVX vermittelte Resistenzen. Im Falle des AIMV-Hüllproteins scheint, wie u.a. Versuche mit verschiedenen Mutanten zeigen, nicht nur die Inhibierung der Partikeldisassemblierung eine Rolle bei der Ausprägung der Resistenz zu spielen, sondern auch Interaktionen mit der viralen RNA, wodurch der natürlichen Ablauf der Replikation gestört werden könnte (Reusken et al., 1994; Taschner et al., 1994). Eine mögliche Wirkungsweise des PVX-Hüllproteins wurde von Spillane et al. (1997) beschrieben. Danach scheint das in der transgenen Pflanze exprimierte PVX-Hüllprotein nicht in die Disassemblierungsprozesse einzugreifen, sondern vielmehr die Replikation sowie die Translation der viralen RNA zu verhindern, indem es mit dem ‚*origin of assembly*‘ im 5'-terminalen Bereich des PVX-Genoms interagiert. Eine zusätzliche Beeinflussung des Langstreckentransports kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Eine weitere Form der Protein-vermittelten Resistenz ist bei Expression viraler Transportproteine in transgenen Pflanzen zu beobachten. Transportproteine konnten inzwischen in einer ganzen Reihe verschiedener Viren nachgewiesen werden

(Atabekov and Taliansky, 1990; Maule, 1991) und spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung der Infektion innerhalb der Pflanze, indem sie den Transport von Viruspartikeln oder viraler RNA von Zelle zu Zelle vermitteln (Deom, 1992; Lucas and Gilbertson, 1994). Durch Untersuchungen zur Funktion und Aufgabe der Transportproteine während einer viralen Infektion konnten charakteristische Eigenschaften dieser Proteingruppe aufgedeckt werden, wie z.B. ihre Lokalisation an den Plasmodesmata, die Fähigkeit, die Ausschlußgrenze der Plasmodesmata (SEL: *size exclusion limit*) zu verändern, die Fähigkeit, RNA zu binden und - in einigen Fällen - ihre Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Cytoskelett (Carrington et al., 1996; Lazarowitz and Beachy, 1999).

Bereits kurz nach Entdeckung viraler Gene, die für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung des dazugehörigen Virus verantwortlich waren, wurde vermutet, daß in diesen Sequenzen ein hohes Potential zur Erzeugung pathogen-vermittelter Resistenzen vorhanden sein könnte (Deom et al., 1992). Das erste Beispiel für eine solche Resistenz wurde von Malyashenko et al. (1993) veröffentlicht. Transgene Tabakpflanzen, die eine temperatursensitive Mutante des TMV-Transportproteins exprimierten, zeigten eine deutlich geringere Anfälligkeit gegenüber TMV, wenn sie oberhalb der permissiven Temperaturgrenze gehalten wurden.

Bereits in diesem ersten Versuch deutete sich ein für diese Art von Resistenzherzeugung charakteristisches Merkmal an, das sich in nahezu allen bisher erfolgreichen Ansätzen wiederfindet. Lediglich die Expression dysfunktioneller Transportproteine scheint eine Beeinflussung der Virusausbreitung bewirken zu können. Eine Expression funktionsfähige Transportproteine schien dagegen entweder keinen Effekt auf die Virusinfektion zu haben (Beck et al., 1994; Deom et al., 1990 und 1991; Tacke et al. 1996) oder führte sogar zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber dem Spendervirus (Ares et al., 1998; Cooper et al., 1995; Ziegler-Graff et al., 1991). Teilweise reichten schon geringfügige Änderungen der Ursprungssequenz aus, um die infektionsverstärkende Wirkung des Wildtyp-Transportproteins in den resistenzauslösenden Phänotyp einer Transportprotein-Mutante umzuwandeln (Lapidot et al., 1993).

Obwohl die Transportproteine verschiedener Viren während einer Infektion im großen und ganzen ähnliche Funktionen erfüllen, weisen sie auf Sequenzebene oft nur sehr geringe Gemeinsamkeiten auf (Melcher et al., 1990; Mushegian and Koonin, 1993). Dennoch ist es in einigen Fällen möglich, daß das Transportprotein eines Virus den Transportdefekt eines anderen Virus komplementieren kann, auch wenn diese nicht direkt miteinander verwandt sind (Lauber et al., 1998; Morozov et al., 1997; Solov'yev et al., 1996 und 1999). Diese Beobachtungen geben Anlaß zu der Vermutung, daß sich mit Hilfe von Transportproteinen Resistenzen schaffen lassen, die sich nicht nur auf das Spendervirus auswirken, wie es bei den meisten Hüllprotein-vermittelten Resistenzen der Fall ist, sondern daß sich diese Hemmwirkung auch auf heterologe Viren übertragen läßt. Dies eröffnet die Möglichkeit, durch den Transfer eines einzigen Gens multiresistente Pflanzen zu schaffen. Tatsächlich konnte diese Vermutung inzwischen durch zahlreiche Beispiele bestätigt werden. So erwiesen sich transgene Pflanzen, die eine dysfunktionelle Variante des TMV-Transportproteins exprimierten, nicht nur gegenüber TMV als resistent, sondern auch gegenüber Vertretern gänzlich anderer Virusgruppen, wie den Tobraviren, den Nepoviren, den Alfamoviren, den Caulimoviren und den Cucumoviren (Cooper et al., 1995). Auch Pflanzen, die eines der *Triple gene block*-kodierte Transportproteine des *White clover mosaic virus* (WCIMV) exprimierten, zeigten nicht nur hochgradige Resistenzen gegenüber verschiedenen WCIMV-Stämmen, sondern auch gegenüber anderen Viren mit *Triple gene block*, darunter PVX, *Narcissus mosaic virus* (NMV) und *Potato virus S* (PVS) (Beck et al., 1994).

Die Resistenzwirkung der mutierten Transportproteine ergibt sich vermutlich daraus, daß in den virusinfizierten transgenen Pflanzen die Funktion des nativen Transport-

proteins durch die gleichzeitige Anwesenheit des vom Transgen abstammenden dysfunktionellen Transportproteins so stark beeinträchtigt wird, daß ein normaler Ablauf des Zell-zu-Zell-Transports nicht mehr erfolgen kann. Die Möglichkeiten für die Art der Beeinträchtigung sind vielfältig. Eine Störung der Funktion kann auf der Ebene der Protein-Protein-Interaktion, während des *Targeting* des Transportproteins zur Zellwand oder zu den Plasmodesmata, bei der Interaktion des Transportproteins mit der viralen RNA, bei der Modifikation der Plasmodesmata oder auch nach anderen Mechanismen erfolgen (Beachy, 1997b).

### 1.3.2. RNA-vermittelte Resistenzen

Erste Hinweise darauf, daß es auch andere Formen der Resistenz als die durch Proteine vermittelte geben muß, lieferten Versuche mit Hüllproteingenen von Potyviren. So erwiesen sich transgene Pflanzen, in die eine für das PVY-Hüllprotein kodierende, translatierbare Gensequenz übertragen worden war, als hochgradig resistent gegenüber dem Spendervirus (van der Vlugt et al., 1992). Eine Analyse dieser Pflanzen auf RNA- und auf Proteinebene offenbarte allerdings, daß zwar Hüllprotein-spezifische mRNA nachgewiesen werden konnte, nicht aber das dazugehörige Protein. Weitere Versuche zeigten, daß sich auch nicht-translatierbare oder antisense-Formen der Hüllproteingene des TEV, des PVY und des *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) dazu eigneten, Resistenzen gegenüber dem jeweiligen Spendervirus zu erzeugen (Dougherty et al., 1994; Goodwin et al., 1996; Hammond and Kamo, 1995; Lindbo and Dougherty, 1992; Smith et al., 1994). Lindbo and Dougherty (1992) postulierten, daß in diesen Fällen die von Transgen stammende mRNA die entscheidende Rolle bei der Auslösung des Resistenzmechanismus spielen würde und nicht das Protein.

Weitere Beispiele, bei denen ebenfalls RNA der ausschlaggebende Faktor zu sein scheint, sind durch Replikasen vermittelte Resistenzen. So konnte für die Relikase-sequenzen des PVX (Mueller et al., 1995), des *Cowpea mosaic virus* (Sijen et al., 1995) und des *Pepper mild mottle virus* (Tenllado et al., 1995 und 1996) gezeigt werden, daß es sich bei den beobachteten Resistenzen um RNA-vermittelte Prozesse handelte.

Die bisher bekannten Fälle einer RNA-vermittelten Virusresistenz weisen einige Gemeinsamkeiten auf, die auf einen generellen Mechanismus dieser Prozesse schließen lassen. So zeigte sich, daß die erzeugten Resistenzen in hohem Maße stammspezifisch sind. Im Falle des PVX konnte z.B. eine Hemmwirkung nur gegenüber PVX-Stämmen erreicht werden, die auf Nukleotidebene weniger als 22% Unterschied zum Transgen aufzeigten (Mueller et al., 1995). Desweiteren wiesen die transgenen Pflanzen mit der höchsten Resistenz meist nur sehr geringe Mengen an vom Transgen abstammender mRNA auf, obwohl die Transkriptionsrate des Transgens in einem normalen Bereich lag und damit der ‚*steady state level*‘ dieser mRNA sehr viel höher hätte sein müssen.

Diese und weitere Beobachtungen führten zu dem Schluß, daß dieser Art von RNA-vermittelter Resistenz ein Mechanismus zugrundeliegen muß, der auf einem vielschichtigen Prozeß beruht, der häufig in transgenen Pflanzen zu beobachten ist: Dem sogenannten ‚*homology-dependent gene silencing*‘ (Baulcombe, 1996a; Matzke and Matzke, 1995 a und b; Meyer and Saedler, 1996; Wassenecker and Pélissier, 1998).

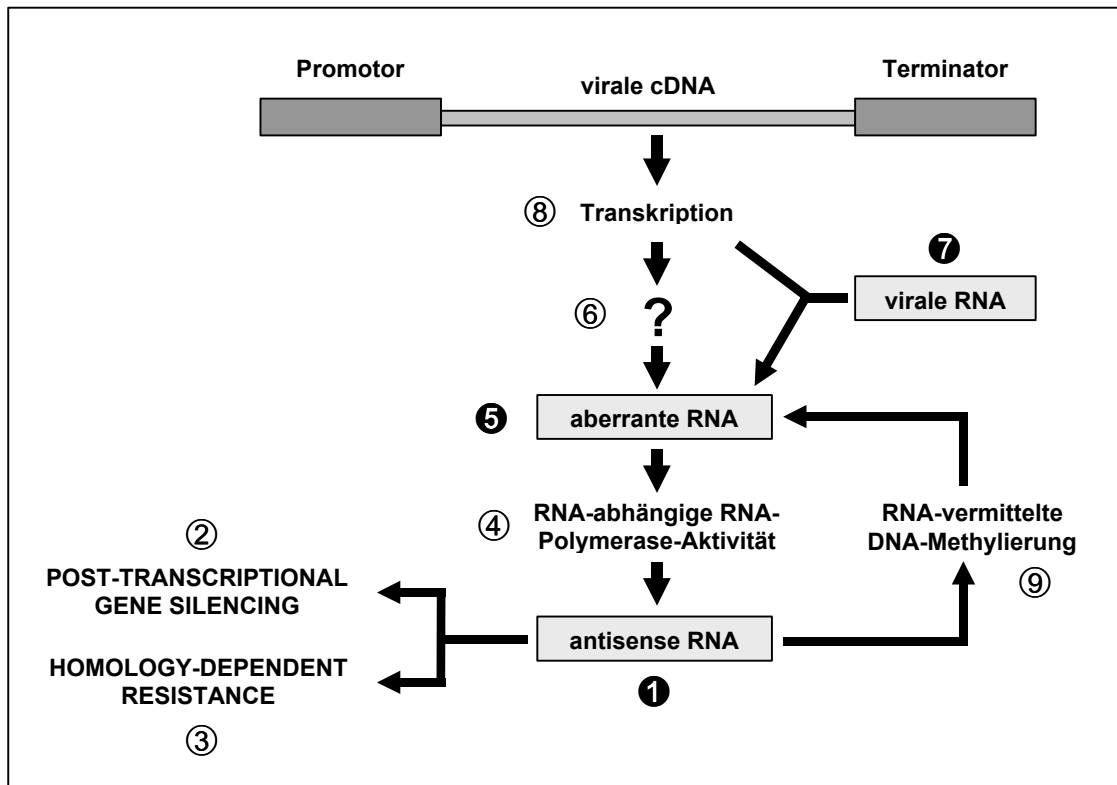


Abb. 1: Modell für den Mechanismus des 'homology-dependent gene silencing'.  
(modifiziert nach Wassenegger and Pélissier, 1998); Erläuterung vgl. Text

Auf der Basis des 'homology-dependent gene silencing' wurde ein Modell entwickelt, das die für die Ausbildung einer RNA-vermittelten Virusresistenz notwendigen Mechanismen zu erklären versucht (Baulcombe, 1996b; Wassenegger and Pélissier, 1998). Eine Schlüsselrolle spielt hierbei eine antisense (as)-RNA, die auf die mRNA des Transgens zurückgeht (vgl. Abb. 1; ❶). Diese asRNA leitet zwei unterschiedliche Prozesse ein. Der eine Prozeß führt zu einer Verhinderung der Akkumulation der vom Transgen abstammenden mRNA (PTGS: *post-transcriptional gene silencing*; ❷), während der andere den eigentlichen Resistenzeffekt zur Folge hat, indem die Akkumulation der viralen RNA unterbunden wird (HDR: *homology-dependent resistance*; ❸). Bisher sind weder die genaue Herkunft noch die tatsächliche Wirkungsweise der asRNA vollständig geklärt. Zahlreiche Hinweise lassen vermuten, daß die Entstehung der asRNA in engem Zusammenhang mit der Aktivität einer pflanzeigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp: *RNA-dependent RNA polymerase*; ❹) steht (Prins and Goldbach, 1996; Sijen et al., 1996; Smith et al., 1994). Die RdRp erkennt eine auf der Sequenz des Transgens basierende, aberrante RNA und nutzt diese als Template zu Produktion der asRNA. Die aberrante RNA (❺) ist das Produkt eines bisher nicht genau definierten Prozesses (❻), der beispielsweise einen vorzeitigen Abbruch der Transkription des Transgens, eine fehlerhafte Prozessierung oder einen Abbau der vom Transgen abstammenden mRNA beinhalten kann. Auslöser für die Produktion dieser aberranten RNA könnte eine übermäßige Akkumulation viraler Sequenzen sein, die aus dem gleichzeitigen Ablauf der Replikation der viralen RNA (❼) und der Transkription des viralen Transgens (❽) in der virusinfizierten, transgenen Pflanze resultiert. Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung der aberranten RNA besteht in einer durch die virale RNA oder die asRNA vermittelten Methylierung der transgenen DNA (❾), die darauf einen vorzeitigen Abbruch der Transkription und damit die Bildung aberranter mRNAs nach sich zieht.

Für die Beteiligung der asRNA an der Auslösung des PTGS und der HDR sind mehrere Wirkungsweisen denkbar, die allerdings alle auf der Bildung einer RNA/RNA-Duplex zwischen asRNA und homologen Bereichen in der mRNA des Transgens bzw. der viralen RNA beruhen. Nach einem von Nicholson (1996) vorgeschlagenen Mechanismus könnte die Bildung der RNA/RNA-Duplex zu einem Abbau der jeweiligen RNA durch Doppelstrang-spezifische RNasen führen. Oder es kann durch die Anlagerung der asRNA zu einer Blockierung der Translation des Transgens oder der viralen RNA kommen, wodurch nicht nur die Entstehung von Protein unterbunden wird, sondern auch eine Destabilisierung der jeweiligen RNA bewirkt werden kann (Green, 1993).

Beide der genannten Mechanismen haben zur Folge, daß eine Akkumulation der vom Transgen abstammenden mRNA sowie der viralen RNA direkt unterbunden wird. Eine weitere Möglichkeit, in der eine RNA-Akkumulation auf indirektem Wege beeinflusst werden kann, besteht dagegen nur für die virale RNA. So könnten durch die Anlagerung der asRNA in *cis*-wirkende Elemente des viralen Genoms verdeckt werden, so daß eine Interaktion mit einem viruskodierten Protein nicht mehr möglich ist. Diese Interaktion könnte für verschiedene Prozesse des Infektionsverlaufs wie der Virusreplikation oder der Virusausbreitung essentiell sein, so daß eine Inhibition der Interaktion indirekt einen entscheidenden Einfluß auf die Virusakkumulation in der Pflanze haben könnte.

Auch wenn bei weitem noch nicht sämtliche Aspekte geklärt werden konnten, so dient dieses Modell doch als Leitlinie für zukünftige Untersuchungen, um weitere Erkenntnisse über den Mechanismus des ‚*homology-dependent gene silencing*‘ im allgemeinen und der ‚*homology-dependent resistance*‘ im besonderen gewinnen zu können.

### 1.3.3. Resistenzen durch nicht-virale Sequenzen

In den bisher aufgeführten Beispielen dienten ausschließlich virale Sequenzen als Grundlage für die Erzeugung von Resistenzen gegenüber Pflanzenviren. Verschiedene Ansätze der letzten Jahre haben allerdings gezeigt, daß auch Sequenzen nicht-viralen Ursprungs durchaus in der Lage sein können, Virusresistenzen in transgenen Pflanzen zu vermitteln. So existieren eine ganze Reihe von Berichten, in denen virusresistente Pflanzen mit Hilfe von sogenannten Ribosomen-inaktivierenden Proteinen (RIPs) gewonnen werden konnten (Moon et al., 1997; Tumer et al., 1997; Wang et al., 1998). RIPs sind Bestandteile des pflanzlichen Verteidigungssystem, mit dessen Hilfe sich Pflanzen vor Stress und gegenüber Pathogenen zu schützen versuchen. RIPs konnten inzwischen in zahlreichen Pflanzen in verschiedenen Organen, wie Samen, Blättern, Wurzeln und Knollen nachgewiesen werden (Stirpe et al., 1992). Sie haben die Fähigkeit, die Ribosomenaktivität in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen zu unterbinden, indem sie einen spezifischen Adeninrest von einer hochkonservierten Region an der Oberfläche der großen rRNA beseitigen (Endo and Tsurugi, 1987; Hartley et al., 1991; Prestle et al., 1992; Sallustio and Stanley, 1990). Die depurinierten Ribosomen sind darauf nicht mehr in der Lage, den Prozeß zu durchlaufen, der für die Translokation entlang der mRNA notwendig ist, so daß die Proteinsynthese damit unterbunden wird. Für einige RIPs konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß sie *in planta* eine Infektion mit Pflanzenviren verhindern können (Chen et al., 1991). Auch durch gemeinsame Inokulation von Virus und RIPs auf anfällige Pflanzen konnte die Infektiösität verschiedener Viren deutlich herabgesetzt werden (Grass and Shepherd, 1978; Tomlinson et al., 1974; Wyatt and Shepherd, 1969). Beispiele für mit Hilfe von RIPs erzeugte Virusresistenzen in transgenen Pflanzen sind Resistenzen verursacht durch verschiedene Formen des ‚*Pokeweed antiviral protein*‘ (PAP) gegen CMV, *Potato leaf roll virus* (PLRV), PVX, PVY und TMV (Lodge et al., 1993; Moon et al., 1997; Tumer et al., 1997; Wang et al., 1998), durch Trichosanthin gegenüber *Turnip mosaic virus*



(TuMV) (Lam et al., 1996) und durch Dianthin gegenüber *African cassava mosaic virus* (ACMV) (Hong et al., 1996).

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung virusresistenter Pflanzen mit Hilfe nicht-viraler Sequenzen ist die Verwendung von Komponenten des 2'-5'-Oligoadenylatsystems aus Säugetieren. Dieses System ist im Säugerorganismus Bestandteil eines Interferon-induzierten universellen Prozesses zur Abwehr viraler Infektionen. Es umfasst im wesentlichen zwei Komponenten, die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase und die Ribonuklease L, und wird durch doppelsträngige RNA, wie sie auch als natürliches Zwischenprodukt bei der Replikation von Viren anfällt, aktiviert. Die Aktivierung dieses Systems führt schließlich zur Degradierung der viralen RNA in der Zelle.

Die universelle Wirkungsweise machte dieses System für die Erzeugung von Virusresistenzen mit breitem Wirkungsspektrum in Pflanzen interessant. Tatsächlich konnte durch Expression der 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase allein oder in Kombination mit der Ribonuklease L transgene Kartoffel- bzw. Tabakpflanzen geschaffen werden, die sich als resistent gegenüber CMV, PVX und PVY erwiesen (Ogawa et al., 1996; Truve et al., 1993 und 1994).

RNA-Degradierung als Mittel zur Resistenzерzeugung machten sich auch Watanabe et al. (1995) zunutze. Pflanzen, die eine Ribonuklease aus Hefe exprimierten, zeigten Resistenzen gegenüber *Tomato mosaic virus* (ToMV), CMV und PVY. Es wird vermutet, daß diese Ribonuklease wie die Ribonuklease L des 2'-5'-Oligoadenylatsystems die doppelsträngige RNA, die während der viralen Replikation entsteht, erkennt und abbaut und es dadurch zur Ausbildung einer Virusresistenz kommt.

Einen interessanten Ansatz zur Erzeugung von Breitspektrum-Resistenzen speziell gegenüber Potyviren, ist die Verwendung von Cysteinproteinase-Inhibitoren oder auch Cystatinen. Cystatine inhibieren Sulfhydryl-Proteinaseaktivitäten und konnten nicht nur in tierischen Zellen, sondern auch in verschiedenen Pflanzengeweben, wie z.B. Samen, Knollen und reifenden Früchten nachgewiesen werden (Barrett, 1987; Depico et al., 1993; Fernandes et al., 1993; Waldron et al., 1993). Die Aufgaben dieser Proteine ist bisher nur teilweise geklärt. Zwei verschiedene Funktionen sind denkbar: Zum einen eine Beteiligung an der Regulation des Protein-Stoffwechsels und zum anderen eine Teilnahme am pflanzeigenen Abwehrsystem zur Verhinderung von Insektenbefall (Turk and Bode, 1991). In Zusammenhang mit der letztgenannten Funktion konnte bereits gezeigt werden, daß pflanzliche Cystatine zur Verdauung notwendige Cystein-Proteasen aus dem Darm von Insekten effektiv hemmen können und damit eine insektizide Wirkung besitzen. Cystein-Proteasen spielen auch während des Infektionszyklus der Potyviren eine essentielle Rolle. Diese Enzyme sind für die Prozessierung des bei Translation der viralen RNA entstehenden Polyproteins notwendig und sind damit für die Etablierung einer potyviralen Infektion unentbehrlich. Durch Expression von Cystatinen in transgenen Pflanzen, sollte es daher möglich sein, eine Inhibition dieser Proteasen und damit eine Verhinderung der Virusinfektion zu bewirken. Mit Hilfe des Oryzacystatins, eines Cysteinproteinase-Inhibitors aus Reis, gelang es tatsächlich Virusresistenzen gegenüber den Potyviren TEV und PVY in Pflanzen zu erzeugen, die dieses Protein zu hohen Anteilen exprimierten (Gutierrez-Campos, et al., 1999).

Auch die Expression von sogenannten Plantibodies - in einer transgenen Pflanze gebildete Antikörper, die gegen ein bestimmtes Pflanzenvirus gerichtet sind - kann zu virusresistenten Pflanzen führen (Fecker et al., 1997; Tavladoriki et al., 1993; Voss et al., 1995). Ebenso wie die Verwendung von pflanzeigenen Resistenz-Genen, die

sonst auf natürlichem Wege eine Resistenz gegenüber Viren mit korrelierenden antiviralen Genen vermitteln (Whitham et al., 1994 und 1996; Dinesh-Kumar et al., 1995).

Die obigen Ausführungen verdeutlichen, welch enormes Potential in der gentechnischen Erzeugung virusresistenter Pflanzen zur Vermeidung bzw. Einschränkung von Virusinfektionen und den daraus resultierenden agrarwirtschaftlichen Schäden vorhanden ist. Ein wesentliches Problem bei der Nutzung dieser Strategie zur Virusbekämpfung liegt allerdings in der zeitaufwendigen und arbeitsintensiven Herstellung transgener Pflanzen. Aus diesem Grund beschränken sich die Versuche zur Erzeugung virusresistenter Pflanzen meist auf Sequenzen, die nach heutigen Erkenntnissen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Virusresistenz führen oder sich in einem anderen System bereits als antiviral erwiesen haben. Eine Optimierung dieser Sequenzen hinsichtlich Effektivität und biologischer Sicherheit bzw. die Testung zufällig gewählter Sequenzen viralen oder auch nicht-viralen Ursprungs unterbleibt in den meisten Fällen. Die Etablierung eines Systems, mit dessen Hilfe sich das antivirale Potential beliebiger Sequenzen schnell und zuverlässig testen lassen könnte, würde einen signifikanten Beitrag zur Gewinnung transgener Pflanzen mit effektiven Resistenzen und hohem Sicherheitsstatus leisten.

Als ideale Grundlage für ein solches Testsystem könnten virale Vollängenkclone von Pflanzenviren dienen, da diese eine unkomplizierte und effiziente Expression beliebiger Sequenzen innerhalb von kurzer Zeit ermöglichen. Worum es sich bei viralen Vollängenklonen im einzelnen handelt und wie sie zur Expression von Fremdsequenzen genutzt werden können, soll in den folgenden Teilkapiteln verdeutlicht werden.

## 2. Virale Vollängenkclone

Virale Vollängenkclone basieren auf dem Genom von Pflanzenviren und eröffnen die Möglichkeit, Virussequenzen für gentechnische Arbeiten - wie das Vornehmen von Mutationen, Deletionen oder Insertionen - zugänglich zu machen. Die relativ hohe Toleranz von Pflanzenviren gegenüber Manipulationen ihres Erbgutes ermöglicht die Nutzung viraler Vollängenkclone als Systeme zur Expression von Fremdproteinen in Pflanzen. Beliebige Nukleinsäuresequenzen können an geeigneter Stelle in den Vollängenklon integriert und zusammen mit der viralen Sequenz in Wirtspflanzen zur Expression gebracht werden.

Erste Versuche zur Erzeugung von viralen Vollängenkklonen gehen auf doppelsträngige DNA-Viren zurück, da sich das DNA-Genom dieser Viren durch die damals zur Verfügung stehenden Techniken sehr viel leichter manipulieren ließ als das RNA-Genom der meisten anderen Pflanzenviren (Gronenboom et al., 1981). Durch den Austausch nicht-essentieller viraler Gene gelang die Integration und Expression verschiedener Fremdgene über einen auf CaMV basierenden Vektor (Brisson et al., 1984; De Zoeten et al., 1989; Futterer et al., 1990; Lefebvre et al., 1987). Ein bedeutender Nachteil dieses Systems bestand allerdings darin, daß lediglich eine Integration von Sequenzen mit einer maximalen Größe von ungefähr 1000 bp möglich war, ohne daß das Konstrukt seine Infektiosität verlor (Hirochika and Hayashi, 1991).

Das gleiche Problem ergab sich auch bei der Verwendung von Viren mit einzelsträngiger DNA - den bipartiten Geminiviren -, bei denen das nicht-essentielle Hüllproteingen leicht gegen verschiedene Sequenzen ausgetauscht werden konnte (Hayes et al., 1988; Ward et al., 1988). Obwohl ihre Eigenschaften, in infizierten Zellen in hoher Kopienzahl vorzuliegen und im Kern zu replizieren, Geminiviren zu attraktiven Kandidaten für die Schaffung viraler Expressionsvektoren machte, zeigte es sich, daß die Größe der

integrierten Sequenz nicht die des ursprünglich vorhandenen Hüllproteingens überschreiten durfte. Andernfalls verlor das Virus seine Fähigkeit, sich systemisch in der infizierten Pflanze auszubreiten (Elmer and Rogers, 1990; Hayes et al., 1989).

Obwohl mehr als 80% der bekannten Pflanzenviren zu den RNA-Viren zählen, gewannen virale Expressionsvektoren, die auf den Genomen von Viren mit einzelsträngiger RNA basierten, erst einige Zeit später an Bedeutung. Dies war in erster Linie auf Schwierigkeiten zurückzuführen, die sich aus der gentechnischen Manipulation von RNA ergaben. Nachdem allerdings Ahlquist et al. (1984a und b) erstmals zeigen konnten, daß sich *in vitro*-Transkripte des in cDNA-Sequenzen umgeschriebenen RNA-Genoms des *Brome mosaic virus* (BMV) nach Inokulation auf geeignete Wirtspflanzen als infektiös erwiesen, wurde die Herstellung von Vollängenklone auf der Basis von RNA-Viren zur Routine. Das virale RNA-Genom wird hierzu zunächst in eine ganzlängige cDNA-Sequenz umgeschrieben und diese schließlich unter Kontrolle eines geeigneten Promotors, z.B. den aus Bakteriophagen stammenden Promotoren SP6 und T7 oder dem 35S RNA-Promotor aus dem *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), gebracht. cDNA-Klone unter Kontrolle des CaMV 35S RNA-Promotors haben den Vorteil, daß sie direkt in die zu infizierende Pflanze über mechanische Inokulation eingebracht werden können, da über diesen Promotor eine Transkription der DNA-Sequenz in eine virale RNA direkt *in vivo* ermöglicht wird. SP6- bzw. T7-kontrollierte Vollängenklone müssen dagegen erst einer *in vitro*-Transkription unterzogen werden. Die hierdurch entstandenen RNA-Transkripte können dann ebenfalls durch mechanische Inokulation in die zu infizierende Pflanze eingebracht werden. In der Pflanzenzelle dient das primäre Transkript dann als Basis für Translations- und Replikationsprozesse, die schließlich zur Etablierung einer normalen Virusinfektion führen.

Auf RNA-Viren basierende Vollängenklone haben sich mittlerweile als effektives Werkzeug zur Expression von Nukleinsäuresequenzen erwiesen.

## 2.1. Strategien zur Expression von Fremdsequenzen über virale Vollängenklone

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, nach denen eine Fremdsequenz über einen viralen Vollängenklon exprimiert werden kann. Die einfachste und damit auch die zu Beginn am häufigsten angewendete Strategie ist der Austausch eines für die Virusvermehrung bzw. -ausbreitung nicht zwingend erforderlichen viralen Gens gegen die zu exprimierende Fremdsequenz. Dies ermöglicht es, vom Virus selbst verwendete Expressionsstrategien, wie z.B. die Expression über subgenomische Promotoren, zu nutzen. Oftmals handelt es sich bei diesen nicht-essentiellen Gensequenzen um für das virale Hüllprotein kodierende Bereiche. Beispiele, in denen eine Fremdsequenz anstelle des Hüllproteingens exprimiert wird, sind neben den zuvor beschriebenen Expressionsvektoren auf der Basis von DNA-Viren und bipartiten Geminiviren virale Vollängenklone des BMV (French et al., 1986) und des *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (Scholthof et al., 1993a). Aber auch andere Teilbereiche viraler Genome lassen sich durch Fremdsequenzen ersetzen, ohne daß der so veränderte Vollängenklon seine Infektiösität verliert. So erwies sich ein cDNA-Klon der RNA3 des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) in Kombination mit den BNYVV RNAs 1 und 2 auch dann noch als infektiös, nachdem weite Bereiche der zentralen Region deletiert worden waren (Jupin et al., 1990; Lauber et al., 1999). Dies eröffnete die Möglichkeit, über diesen Klon verschiedene Fremdsequenzen zu exprimieren (Bleykasten-Grosshans et al., 1997; Jupin et al., 1992; Lauber et al., 1998). Auch Guilford et al. (1991) gelang es, die kodierende Sequenz für das 16 kDa-Protein in einem Vollängenklon der RNA1 des

*Tobacco rattle virus* (TRV) gegen das Hüllproteingen des TMV zu ersetzen, ohne daß dieser seine Infektiösität verlor.

In den meisten Fällen führte diese Strategie des Genaustauschs allerdings - wenn überhaupt - nur zu einer sehr geringen Fremdgenexpression. Häufig konnten aufgrund des Verlusts eines viralen Gens Beeinflussungen in der Replikation (Joshi et al., 1990), der lokalen und systemischen Virusausbreitung (Chapman et al., 1992; Takamatsu et al., 1987) oder der Virusakkumulation (Scholthof et al., 1993b) beobachtet werden.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden Strategien entwickelt, in denen versucht wurde, die aufgrund der Deletion des viralen Gens entstehenden Defekte *in trans* zu komplementieren und dadurch einen normalen Infektionsverlauf zu ermöglichen. Diese *in trans*-Komplementation könnte z.B. über die Expression des fehlenden viralen Gens in transgenen Pflanzen, über eine Koinfektion mit Helferviren oder - wie bereits für ein auf *Cucumber mosaic virus* (CMV) basierendes System gezeigt werden konnte - durch Kombination verschiedener viraler Komponenten mit unterschiedlichen Modifikationen geschehen, die sich in ihren Defekten gegenseitig komplementieren und damit eine Expression von integrierten Fremdsequenzen erlauben (Zhao et al., 2000).

Eine ebenfalls recht unkomplizierte Strategie mit allerdings sehr eingeschränkter Anwendbarkeit besteht darin, die gewünschte Fremdsequenz einfach in Fusion mit dem Hüllproteingen über den dieser Sequenz vorgeschalteten subgenomischen Promotor zu exprimieren. Diese Art der Expression eignet sich vor allem für die Nutzung zur Epitop-Präsentation (Joelson et al., 1997; Palmer et al., 1999; Yusibov et al., 1997). Um eine Präsentation der gewünschten Sequenz zu erreichen, sollte die Fusion mit der viralen Hüllproteinsequenz in der Weise erfolgen, daß zum einen eine Assemblierung der Hüllprotein/Fremdprotein-Fusionen zu Viruspartikeln noch möglich ist und zum anderen der Fremdproteinanteil an der Oberfläche der Partikel zu liegen kommt. Die Epitop-präsentierenden Viruspartikel können durch Aufreinigung aus den infizierten Pflanzen in relativ großen Mengen (bis zu 1 mg pro Gramm Blattmaterial) gewonnen werden. Die aufgereinigten chimären Partikel dienen schließlich zur Erzeugung von Antikörpern, die sich gegen die auf der Partikeloberfläche präsentierten Epitope richten. Mit Hilfe dieses Systems konnte bereits eine Reihe von Antikörpern gegen verschiedene menschliche und tierische Krankheitserreger gewonnen werden, darunter Antikörper gegen antigene Komponenten des *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV), des *Mink enteritis virus* (MEV), des *Rabbit hemorrhagic disease virus* (RHDV), des *Human immunodeficiency virus* Typ 1 (HIV-1) und des *Human rhinovirus* 14 (HRV-14) (Dalsgaard et al., 1997; Fernández-Fernández et al., 2001; Lomonosoff and Johnson, 1995; McLain et al., 1995; Porta et al., 1994; Usha et al., 1993; Zhang et al., 2000; Wigdorovitz et al., 1999).

Weitaus mehr Möglichkeiten bieten Vektorsysteme, die zusätzlich in die virale Sequenz eingeführte subgenomische Promotorsequenzen zur Fremdgenexpression nutzen. In den meisten Fällen handelt es sich auch hier um Hüllproteinpromotoren, da sich mit diesen eine besonders effektive Expression erreichen läßt. Eines der ersten Beispiel für eine solche Strategie war ein Vollängenklon des TMV, in dem eine verdoppelte Hüllproteinpromotorsequenz zur Expression einer zwischen Transportproteingen und Hüllproteingen klonierten Fremdsequenz diente (Dawson et al., 1989). Infektionsversuche mit diesem Konstrukt zeigten allerdings, daß die Fremdsequenz im Laufe der Infektion häufig durch Rekombinationsprozesse zwischen homologen Bereichen des nativen und des zusätzlichen Hüllproteinpromotors eliminiert wurde. Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion konnte dann nur noch die Wildtyp-Sequenz des Virus nachgewiesen werden. Die fehlende Insertstabilität konnte allerdings dadurch behoben werden, daß anstelle des homologen Promotors heterologe Sequenzen aus verwandten Tobamoviren, wie dem *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) oder dem *Tobacco mild*

*green mosaic virus* (TMGMV), zur Fremdgenexpression verwendet wurden (Donson et al., 1991; Kearney et al., 1993; Shivprasad et al., 1999).

Ein ähnlicher Ansatz wurde auch von MacFarlane and Popovich (2000) zur Erzeugung von Expressionsvektoren auf der Basis von Tobraviren verfolgt. In infektiöse Klone der RNA2 der Tobraviren TRV, *Pea early-browning virus* (PEBV) und *Pepper ringspot virus* (PepRSV) wurde jeweils eine heterologe Hüllproteinpromotorsequenz aus einem der beiden anderen Tobraviren übertragen und zur Expression des Reporterproteins GFP genutzt. In allen Fällen konnte eine GFP-Fluoreszenz einige Tage nach Inokulation dieser Konstrukte gemeinsam mit der entsprechenden RNA1 detektiert werden. Ein Insertverlust durch homologiebedingte Rekombination konnte nicht beobachtet werden.

Eine interessante Alternative zur Fremdgenexpression über zusätzliche subgenomische Promotorsequenzen ist die Verwendung von spezifischen Sequenzen, die trotz gemeinsamer Transkription zweier hintereinandergeschalteter Gene ausgehend von einem Promotor die Entstehung voneinander unabhängiger Proteine erlauben. Zu diesen Sequenzen gehört das Peptid P2A aus dem Picornavirus FMDV (*Foot-and-mouth disease virus*). P2A besteht lediglich aus 16 Aminosäuren und bewirkt unter nativen Bedingungen eine Trennung des FMDV-Polypeptids zwischen dem C-terminalen Glycin-Rest der P2A-Sequenz und dem N-terminalen Prolin-Rest der dahinterliegenden P2B-Sequenz (Ryan et al., 1991). Obwohl in einem Leseraster liegend entstehen auf diese Weise zwei voneinander unabhängige Proteine. Der Mechanismus dieses Prozesses basiert nicht - wie bis vor kurzem angenommen - auf einer durch P2A vermittelten Proteolyse (Ryan et al., 1991; Ryan et al., 1994; Donnelly et al., 1997), sondern erfolgt auf translationeller Ebene. Nach einem von Donnelly et al. (2001a) vorgeschlagenen Modell beeinflusst P2A die Aktivität des Ribosoms in einer Weise, die zu einer Hydrolyse der Peptidyl-tRNA-Esterbindung am C-Terminus der P2A-Sequenz führt. Das bereits synthetisierte Polypeptid wird dabei aus dem translationellen Komplex entlassen und die Translation der nachfolgenden Sequenz fortgesetzt. Ergebnis dieses Prozesses sind schließlich zwei voneinander unabhängige Polypeptidketten.

Zahlreiche Versuche mit synthetischen und rekombinanten Polyproteinen zeigten, daß P2A auch außerhalb des FMDV-Systems in der Lage ist, eine Trennung von Polyproteinen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu bewirken (Chaplin et al., 1999; De Felipe et al., 1999; Donnelly et al., 2001a, b; Ryan et al., 1994). In einem solchen artifiziellen Polyproteinsystem entstehen allerdings zusätzlich zu den Einzelproteinen geringe Anteile (bis zu 10%) eines Fusionsproteins aus den beiden durch P2A gekoppelten Proteinen. Dieses Phänomen ist durch eine suboptimale Aktivität des P2A außerhalb des nativen Kontextes zu erklären (Donnelly et al., 2001b).

Die Eigenschaft, auch außerhalb des natürlichen Kontextes eine Trennung gemeinsam exprimierter Gensequenzen vermitteln zu können, machte die P2A-Sequenz attraktiv für eine Nutzung zur Fremdgenexpression über virale Vollängenklone. Santa Cruz et al. (1996) verwendeten diese Sequenz erstmals in einem auf PVX basierenden cDNA-Klon. In dieses Konstrukt war die für das P2A kodierende Sequenz zusammen mit einer kurzen *Multicloning-Site* (MCS) zwischen Hüllproteinpromotor und Hüllproteingen eingeführt worden. Über die MCS konnten dann beliebige Fremdgene in der Weise integriert werden, daß sie in einem gemeinsamen Leseraster mit den dahinterliegenden Sequenzen des P2A-Gens und des Hüllproteingens lagen. Dies ermöglichte schließlich eine gemeinsame Transkription der fusionierten Sequenzen ausgehend vom viruseigenen Hüllproteinpromotor mit anschließender Trennung des Fremdproteins vom Hüllprotein im nachfolgenden Translationsprozeß. Auf diese Weise konnte eine Expression einer unabhängigen Fremdsequenz zu hohen Anteilen erreicht werden, ohne daß der natürliche Infektionsverlauf dadurch beeinflusst wurde.

Dieses System wurde inzwischen auch für andere virale Expressionsvektoren genutzt. So integrierten Zhang and French (1997) die P2A-Gensequenz ebenfalls zwischen Hüllproteinpromotor und Hüllproteingen, um eine Expression der Reporterproteine GUS und GFP über einen auf dem *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) basierenden Vollängerklon zu erreichen. Durch Integration der P2A-Gensequenz an verschiedenen Stellen eines infektiösen Klon der RNA2 des *Cowpea mosaic virus* (CPMV) konnten mehrere Konstrukte geschaffen werden, die eine effiziente Expression eines zusätzlich integrierten GFP-Gens erlauben (Gopinath et al., 2000).

Eine besondere Möglichkeit zur Fremdgenexpression bieten Viren, deren Genom als Polyprotein exprimiert wird, welches posttranslationell mit Hilfe viruskodierter Proteasen in Einzelproteine prozessiert wird. Hierzu gehören z.B. die Comoviren, wie das zuvor erwähnte CPMV, und die Potyviren. Die besondere Expressionsstrategie dieser Viren erlaubt es, eine Fremdsequenz ‚*in frame*‘ in das einzige offene Leseraster des viralen Genoms zu integrieren; das davon abgeleitete Fremdprotein wird als Bestandteil des viralen Polyproteins exprimiert und kann nach Translation über zusätzlich eingeführte Proteaseerkennungssequenzen im Zuge des natürlichen Prozessierungsprozesses freigesetzt werden. Diese Art der Expression stellt zum einen sicher, daß das gewünschte Fremdprotein auch tatsächlich gebildet wird, und zum anderen, daß es zu ebenso hohen Anteilen produziert wird wie die viralen Proteine. Beispiele hierfür sind Expressionsvektoren basierend auf dem Comovirus CPMV (Verver et al., 1998; Gopinath et al., 2000) oder auf den Potyviren *Clover yellow vein virus* (CIYVV), *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Plum pox virus* (PPV) und *Tobacco etch virus* (TEV) (Dolja et al., 1998; Fernández-Fernández et al., 2001; German-Retana et al., 2000; Guo et al., 1998; Masuta et al., 2000).

## 2.2. Anwendungsmöglichkeiten viraler Vollängerklone

Ungeachtet dessen, welche Strategie nun letztendlich für eine Fremdgenexpression verwendet wurde: Virale Vollängerklone haben sich im Laufe der letzten Jahre als effektive Werkzeuge für eine ganze Reihe unterschiedlicher Anwendungen erwiesen. Besonders im Hinblick auf die schnelle und preiswerte Produktion spezifischer Proteine für therapeutische oder industrielle Zwecke haben virale Vollängerklone mehr und mehr an Bedeutung gewonnen. Mit Hilfe viraler Vollängerklone konnten inzwischen nicht nur, wie bereits beschrieben, Impfstoffe gegen eine Reihe von tierischen und menschlichen Krankheitserreger gewonnen werden (s.o.), sondern auch Wirkstoffe wie  $\alpha$ -Trichosanthin (Kumagai et al., 1993), Leu-Enkephalin (Miller et al., 1985), Defensin (Saitoh et al., 2001), Interferon (De Zoeten et al., 1989), verschiedene Antikörper (McCormick et al., 1999; Verch et al., 1998) und ein Inhibitor eines Angiotensin-I-konvertierenden Enzyms (Hamamoto et al., 1993).

Aber auch zur Aufklärung grundlegender pflanzenphysiologischer und molekularbiologischer Prozesse und zur Funktionsanalyse pflanzeigener Proteine konnten virale Vollängerklone bereits einen signifikanten Beitrag leisten. So konnte z.B. durch eine virusvermittelte Expression bestimmter pflanzenkodierter Sequenzen eine Beeinflussung biosynthetischer Stoffwechselprozesse erreicht werden (Kumagai et al., 1995 und 1998; Sablowski et al., 1995). Zudem konnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich pflanzeigener Pathogenabwehr (Hammond-Kosack et al., 1995; Karrer et al., 1998; Rommens et al., 1995; Scholthof et al., 1995; Tobais et al., 1999) oder im Hinblick auf den Mechanismus des ‚*gene silencing*‘ gewonnen werden (Angell and Baulcombe, 1999; Baulcombe, 1999; Ratcliff et al., 1997, 1999 und 2001; Ruiz et al., 1998).

Nicht zuletzt eröffnen virale Vollängenklone die einmalige Möglichkeit, fundierte Kenntnisse über die Mechanismen zu erlangen, die schließlich zu einer durch sie verursachten Infektion führen (Angell et al., 1996; Beck et al., 1991; Chapman et al., 1992; Fedorkin et al., 2000 und 2001; Santa Cruz et al., 1996 und 1998; Sasaya et al., 2000). Ein besseres Verständnis der Prozesse, die an der Auslösung und Verbreitung einer Infektion beteiligt sind, kann letztendlich dazu genutzt werden, neue Strategien für eine effektivere Bekämpfung von Virusinfektionen zu entwickeln.

Eine Nutzung viraler Vollängenklone zur Expression von Sequenzen mit virushemmender Wirkung wurde bereits für einen infektiösen cDNA-Klon der RNA3 des *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) beschrieben (Bleykasten-Grosshans et al., 1997; Lauber et al., 2001).

### 3. Das Genom des *Potato virus X* als Quelle für Sequenzen mit antiviralem Potential

Eine zentrale Rolle bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen spielte das Genom des *Potato virus X* (PVX). Es bildete nicht nur die Grundlage für den infektiösen Vollängenklon, mit dessen Hilfe ein Großteil der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse gewonnen werden konnten, sondern es diente auch als Quelle für verschiedene Nukleinsäuresequenzen, die auf ihr antivirales Potential hin untersucht wurden. Aus diesem Grund soll im folgenden auf die verschiedenen Komponenten des PVX-Genoms und die bisherigen Erkenntnisse über die Fähigkeit diese Komponenten, Virusresistenzen zu vermitteln, eingegangen werden.

#### 3.1. Organisation des PVX-Genoms

Das Genom des PVX umfasst fünf offene Leseraster (ORF), die für virale Proteine mit unterschiedlichen Funktionen kodieren (vgl. Abb. 2). ORF1 kodiert für ein aus 1456 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 166kDa. Dieses als P166 bezeichnete Protein ist vermutlich als Komponente eines Proteinkomplexes an der Replikation der viralen RNA beteiligt.

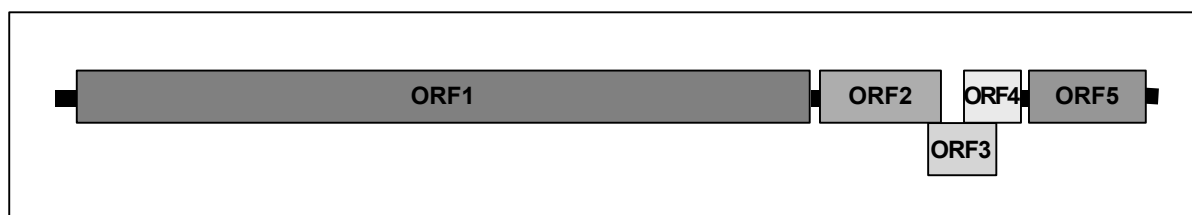


Abb. 2: Schematische Darstellung der Organisation des Genoms des *Potato virus X*

Die sich teilweise überlappenden ORFs 2-4 sind in einem sogenannten *Triple gene block* (TGB) organisiert, der in vergleichbarer Form nicht nur bei Vertretern der Potexviren zu finden ist, sondern auch in verschiedenen anderen Virusgruppen, wie den Benyviren, den Carlaviren, den Furoviren, den Hordeiviren und den Pecluviren (Beck et al., 1991; Gilmer et al., 1992; Herzog et al., 1998; Morozov et al., 1999a; Petty and Jackson, 1990). Die häufig entsprechend ihrer Abfolge als TGBp1 bis 3 bezeichneten Genprodukte des PVX-*Triple gene blocks* besitzen eine molekulare Masse von 25 kDa, 12 kDa und 8 kDa, woraus sich die Bezeichnung P25 für TGBp1, P12 für TGBp2 und P8 für TGBp3 ableitet (Huisman et al., 1988). Auf die genaue Funktion der als Transportproteine fungierenden TGB-Proteine soll später noch einmal ausführlicher

eingegangen werden, da diese Proteine als Sequenzen mit möglichem antiviralem Potential in der vorliegenden Arbeit Gegenstand ausführlicher Untersuchungen waren. Der ORF5 des PVX-Genoms kodiert schließlich für das virale Hüllprotein. Das PVX-Hüllprotein setzt sich aus 238 Aminosäuren zusammen und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 29 kDa. Es ist nicht nur für die Bildung der die virale RNA umgebenden Virushülle zuständig, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Verbreitung des Virus innerhalb der Pflanze (Santa Cruz et al., 1998).

### **3.2. Die verschiedenen Komponenten des PVX-*Triple gene blocks* und ihre Funktionen**

Als Transportproteine vermitteln die durch den *Triple gene block* des PVX kodierten Proteine P25, P12 und P8 den Zell-zu-Zell-Transport des Virus in der infizierten Pflanze (Carrington et al., 1996; Deom et al., 1992; Lucas and Wolff, 1999). Die genaue Funktion dieser Proteine ist - obwohl Gegenstand zahlreicher Untersuchungen - bis heute noch nicht vollständig geklärt. Spezifische Interaktionen zwischen den drei TGB-Proteine als grundlegende Voraussetzung für einen effizienten Zell-zu-Zell-Transport sind sehr wahrscheinlich (Erhardt et al., 1999a und b; Lauber et al., 1998; Solovyev et al., 1999).

Erste Erkenntnisse über die generelle Funktion der TGB-kodierten Proteine von Potexviren lieferten die von Beck et al. (1991) anhand eines Vollängenklons des *White clover mosaic virus* (WCIMV) durchgeführten Untersuchungen. Durch Mutationen in verschiedenen Bereichen des WCIMV-*Triple gene blocks* verloren die mutierten Vollängenklone ihre Fähigkeit, von Zelle zu Zelle zu gelangen. Eine systemische Infektion der inokulierten Pflanzen blieb aus. Daraus schlossen Beck et al. (1991), daß die Proteine des WCIMV-TGB essentiell für den Zell-zu-Zell-Transport dieses Virus sind. Für die TGB-Proteine anderer Potexviren konnte somit eine ähnliche Funktion angenommen werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden inzwischen für verschiedene Viren weitere Eigenschaften der einzelnen TGB-Proteine ermittelt.

So konnten mit Hilfe spezifischer Antikörper die TGBp1-Proteine des PVX und des *Foxtail mosaic virus* (FoMV) mit für diese Virusinfektionen charakteristischen Einschlußkörpern assoziiert im Cytoplasma nachgewiesen werden (Davies et al., 1993; Rouleau et al., 1994). Für das TGBp1 der Potexviren PVX und WCIMV konnte gezeigt werden, daß es in infizierten Zellen in relativ großen Mengen vorhanden ist und daß es in der Lage ist, das Größenausschlußlimit (SEL: *size exclusion limit*) der Plasmodesmata zu erhöhen (Angell et al., 1996; Lough et al., 1998). Mikroinjektionsversuche mit fluoreszenzmarkiertem TGBp1 des WCIMV offenbarten, daß dieses Protein über die Plasmodesmata von Zelle zu Zelle gelangen kann (Lough et al., 1998). In diesem Zusammenhang konnten Yang et al. (2000) durch transiente Expression der Komponenten des PVX-TGB und des PVX-Hüllproteins in verschiedenen Kombinationen nachweisen, daß der Zell-zu-Zell-Transport des P25 wahrscheinlich durch Interaktion mit den übrigen viralen Proteinen reguliert wird. Desweiteren weist die TGBp1-Sequenz verschiedene konservierte Motive auf, die für Proteine mit NTP-Bindungsfähigkeit und Helikasefunktion charakteristisch sind (Gorbalenya and Koonin, 1989 und 1993; Gorbalenya et al., 1988; Skryabin et al., 1988). Im Falle des PVX und des FMV konnte gezeigt werden, daß die TGBp1-Proteine dieser Viren tatsächlich NTP- und RNA-Bindungsfähigkeiten besitzen (Kalinina et al., 1996; Morozov et al., 1999b; Rouleau et al., 1994).

Für die TGB-Proteine 2 und 3 der Potexgruppe stehen dagegen weit weniger Informationen über ihre möglichen Funktionen zur Verfügung.



Sowohl TGBp2 als auch TGBp3 weisen hydrophobe Regionen auf, die charakteristisch für Transmembranproteine sind (Morozov et al., 1987 und 1989), und liegen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit Membran- und Zellwandfraktionen assoziiert vor (Hefferon et al., 1997; Morozov et al., 1990). Die Aminosäuresequenzen der TGBp2-Proteine aller bekannten Viren mit *Triple gene block* sind sich sehr ähnlich und zeichnen sich durch eine konservierte hydrophobe Domäne aus, die von zwei stark hydrophilen Transmembransegmenten flankiert wird. (Morozov et al., 1987 und 1989; Solovyev et al., 1996).

Die TGBp3-Proteine verschiedener Virusgattungen weisen dagegen keine signifikanten Ähnlichkeiten untereinander auf. Hier ist lediglich eine grobe Unterteilung in unterschiedliche Gruppen anhand struktureller Charakteristika möglich. Zu einer ersten Gruppe können die TGBp3-Proteine der Hordei-, Pomo- und Pecluviren zusammengefasst werden. Die Proteine dieser Virusgruppen weisen zwei durch eine hoch konservierte Region getrennte hydrophobe Abschnitte auf und besitzen ein charakteristisches cysteinhaltiges Motiv (His-X-X-X-Cys-X-Cys-X-X-Cys) an ihrem N-Terminus (Solovyev et al., 1996). Die TGBp3-Proteine der Gruppe 2 sind dagegen in den Vertretern der Potex-, Carla-, Alexi- und Foveaviren enthalten. Diese zeichnen sich durch lediglich ein hydrophobes Transmembransegment und durch einen konservierten hydrophilen C-Terminus aus (Morozov et al., 1991). Das TGBp3 der Benyviren schließlich lässt sich keiner der beiden beschriebenen Gruppen zuordnen.

Die genaue Funktion dieser beiden Proteine bleibt nach wie vor unklar. Lough et al. (1998) konnten weder für das TGBp2 noch für das TGBp3 des WCIMV eine Fähigkeit zur Beeinflussung des SEL der Plasmodesmata - wie im Falle des TGBp1 - nachweisen. Gewisse Hinweise auf eine Beteiligung am Zell-zu-Zell-Transport konnten Solovyev et al. (2000) mit Hilfe fluoreszenzmarkierter TGBp2- und TGBp3-Proteine des Hordeivirus *Poa semilatent virus* (PSLV) bzw. des PVX durch transiente Expression dieser Proteine nach Partikelbeschuss erlangen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, daß die subzelluläre Lokalisation des TGBp2 wesentlich durch das TGBp3 bestimmt wurde. Bei alleiniger Expression lag das TGBp2 assoziiert mit Elementen des Endomembransystems, bestehend aus Endoplasmatischem Retikulum, Zellkern und Golgiapparat, vor. Bei gemeinsamer Expression mit dem TGBp3 ergab sich eine drastische Änderung in der subzellulären Lokalisation des TGBp2. Statt in Assoziation mit dem Endomembransystem befand sich das TGBp2 nun in peripheren Einschlüssen entlang der Zellwand - einer Lokalisation, die sich zuvor als charakteristisch für das TGBp3 erwiesen hatte. Eine Kennzeichnung der beiden TGB-Proteine mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern offenbarte eine Kolo-kalisation der Proteine in der exprimierenden Zelle. Vergleichende Studien mit verschiedenen Mutanten des TGBp2 und TGBp3 aus dem PSLV deuten darauf hin, daß der TGBp3-vermittelte intrazelluläre Transport des TGBp2 nicht mit einer direkten Protein-Protein-Interaktion verbunden ist. Vermutlich aktiviert das TGBp3 einen zelleigenen Translokationsmechanismus, über den schließlich der intrazelluläre Transport des membrangebundenen TGBp2-Moleküls - eventuell als Teil eines Ribonukleoprotein-Komplex aus viraler RNA, TGBp1 und Hüllprotein - zur Zellperipherie erfolgt.

### **3.3. Durch die verschiedenen Komponenten des PVX-Genoms vermittelte Resistenzen**

#### **3.3.1. Durch das Replikations-assoziierte Protein P166 vermittelte Resistenzen**

Braun and Hemenway (1992) zeigten erstmals, daß transgene Pflanzen, die das ganz-längige Replikations-assoziierte Protein P166 oder den aminoterminalen Bereich dieser Sequenz exprimierten, resistent gegenüber einer PVX-Infektion waren, unabhängig davon, ob Viruspartikel oder virale RNA als Inokulum verwendet wurden. Die Expres-

sion zweier weiterer Teilstücke des P166 - das ein NTP-Bindungsmotiv umfassende dritte Viertel und das ein konserviertes GDD-Motiv enthaltende letzte Viertel - führte in transgenen Pflanzen dagegen nicht zu einer Hemmung der Virusinfektion.

Longstaff et al. (1993) verwendeten zur Resistenzерzeugung in transgenen Pflanzen Mutanten des P166, in denen das konservierte GDD-Motiv durch Aminosäureaustausch in verschiedene andere Sequenzen umgewandelt worden war. In einer diesem Ansatz vorhergehenden Untersuchung, bei der die entsprechenden Mutationen in die P166-Gensequenz eines PVX-Vollängenklons eingeführt worden waren, hatten sich diese Veränderungen als letal erwiesen. Eine PVX-Infektion konnte sich in den mit den veränderten Vollängenklonen inokulierten Pflanzen aufgrund der dysfunktionellen Replikase-Komponente nicht mehr etablieren. Die Expression dieser dysfunktionellen P166-Varianten in transgenen Pflanzen führte zu einer Resistenz gegenüber PVX (Longstaff et al., 1993; Mueller et al., 1995). Die Veränderung von für die Funktion wichtiger Aminosäuren hat hier - anders als z.B. im Fall der PVY- (Audy et al., 1994) oder der *Alfalfa mosaic virus*-Replikase (Brederode et al., 1995) - offensichtlich keine Einfluß auf die resistenzerzeugende Wirkung des Transgens. Hinzu kommt, daß sich die Resistenzwirkung lediglich auf sehr eng verwandte PVX-Stämme ausweiten ließ. Bereits gegenüber PVX-Stämmen, die auf Nukleinsäureebene lediglich einen Sequenzunterschied von 22% zum Transgen aufwiesen, konnte keine Resistenz mehr beobachtet werden (Mueller et al., 1995). Diese Beobachtungen zusammen mit der Abhängigkeit der Resistenzwirkung von einem extrem niedrigen ‚*steady-state-level*‘ an vom Transgen abstammender RNA in den PVX-resistenten Pflanzen lassen vermuten, daß es sich bei der durch die PVX-Replikase-Komponente vermittelten Resistenz um einen homologieabhängigen Prozeß auf RNA-Ebene (‚*homology-dependent resistance*‘; vgl. A 1.3.2.) handelt, wie er auch für die Replikasesequenzen einiger anderer Viren angenommen wird (MacFarlane and Davies, 1992; Rubino et al., 1993; Rubino and Russo, 1995; Sijen et al., 1995; Tenllado et al., 1995, 1996).

### 3.3.2. Durch die Komponenten des *Triple gene blocks* vermittelte Resistenzen

Bisher beschäftigten sich nur einige wenige Veröffentlichungen mit der Fähigkeit der durch den TGB des PVX kodierten Proteine, eine Resistenz gegenüber PVX und anderen Viren mit TGB zu erzeugen. Ares et al. (1998) konnten für das P25 zeigen, daß P25-transgene Tabakpflanzen eine äußerst geringe Anfälligkeit gegenüber den Tobamoviren TMV und Ob besaßen. Für PVX konnte allerdings kein hemmender Effekt beobachtet werden. Auch für die ganzlängigen, unveränderten Transportproteine P12 und P8 konnte von Seppänen et al. (1997) keine antivirale Wirkung festgestellt werden. Anders verhielt es sich allerdings, wenn in die P12-Sequenz spezifische Linker zwischen der N-terminalen hydrophoben und der zentralen hydrophilen Region eingebracht wurden. Transgene Pflanzen, die diese veränderten Proteine exprimierten, erwiesen sich nicht nur PVX gegenüber als resistent, sondern auch gegenüber einem weiteren Potexvirus (*Potato aucuba mosaic virus*) sowie den Carlaviren *Potato virus M* und *S*.

### 3.3.3. Durch das PVX-Hüllprotein vermittelte Resistenzen

Bisher konnte sowohl in transgenem Tabak (Hemenway et al., 1988; Spillane et al., 1997) als auch in Kartoffel (Feher et al., 1992; Hoekema et al., 1989; Kaniowski et al., 1990; Lawson et al., 1990) durch PVX-Hüllprotein vermittelte Resistenzen erzeugt werden. Die beobachteten Resistenzen beruhen vermutlich auf einem Protein-vermittelten Prozeß. Darauf deutet vor allem die direkte Abhängigkeit der Resistenzausprägung vom Anteil des Hüllproteins in den transgenen Pflanzen hin. Je höher der Anteil an exprimiertem PVX-Hüllprotein, desto effektiver der Hemmeffekt (Hemenway et

al., 1988). Untersuchungen von Spillane et al. (1997) zum Mechanismus der Virushemmung lassen vermuten, daß das in den transgenen Pflanzen exprimierte PVX-Hüllprotein durch Interaktion mit der viralen RNA Replikation und Translation des Virus bereits in der erstinfizierten Zelle verhindert. Auch der Zell-zu-Zell-Transport sowie der Transport über größere Distanzen scheint durch das in den transgenen Pflanzen gebildete Hüllprotein beeinflusst werden zu können.

#### **4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, auf der Basis von viralen Vollängenklonen die Grundlagen für ein nicht-transgenes System zu erarbeiten, mit dessen Hilfe sich das antivirale Potential von Nukleinsäuresequenzen schnell und einfach bestimmen und optimieren läßt. Ein solches System könnte einen signifikanten Betrag zur Schaffung transgener Pflanzen leisten, die aufgrund optimierter Sequenzen eine effiziente Virusresistenz und eine erhöhte biologische Sicherheit aufweisen würden.

Zahlreiche Eigenschaften viraler Vollängenklone machen sie zu idealen Kandidaten für die Etablierung eines solchen Systems. So erlaubt die geringe Größe ihres Genoms eine unkomplizierte Manipulation der viralen Sequenzen. Es können problemlos Modifikationen eingeführt werden, die eine leichte Integration und eine effektive Expression beliebiger Fremdsequenzen ermöglichen. Die chimären Konstrukte können durch einfache mechanische Inokulation auf geeignete Wirtspflanzen appliziert werden. Je nach Zielsetzung können Viren mit engem oder weitem Wirtspflanzenkreis als Grundlage für die Herstellung infektiöser Klone verwendet werden. Die durch virale Vollängenklone hervorgerufene Infektion kann sich innerhalb weniger Tage in der gesamten Pflanze ausbreiten, wobei hohe Expressionsraten der integrierten Fremdsequenz erreicht werden können. Die Bewertung des antiviralen Potentials der integrierten Fremdsequenz ist damit innerhalb von kürzester Zeit möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst für das Testsystem geeignete Vollängenklone gefunden und anschließend zur Expression verschiedener Sequenzen mit möglichem antiviralem Potential verwendet werden. Ein Einfluß dieser Sequenzen auf Virusreplikation und/oder -ausbreitung kann entweder gegenüber dem exprimierenden Virus selbst (homologes System) oder anhand eines Doppelinfektionstests gegenüber einem zweiten Virus (heterologes System) untersucht werden. Werden im Falle des homologen Systems Nukleinsäuresequenzen über einen infektiösen cDNA-Klon exprimiert, die eine hemmende Wirkung auf das durch diesen Klon kodierte Virus hat, so sollte sich diese in einer verminderten Symptombildung, einer geringen Viruskonzentration oder einer eingeschränkten Ausbreitung des Virus bemerkbar machen. Voraussetzung für ein Funktionieren dieses Systems ist allerdings, daß die verwendeten Fremdsequenzen lediglich eine virushemmende Wirkung haben, also die Entstehung einer zumindest geringfügigen, serologisch nachweisbaren Infektion erlauben. Ansonsten ist die Entscheidung, ob eine Infektion aufgrund des antiviralen Effekts der Fremdsequenz nicht erfolgt ist oder ob das verwendete Konstrukt lediglich aufgrund eines Klonierungsfehlers nicht infektiös war, nicht möglich. Die Testung von Nukleinsäuresequenzen in einem heterologen System erfolgt über Doppelinfektionen, in denen eine geeignete Wirtspflanze zunächst mit einem viralen Vollängenklon infiziert wird, in welchen zuvor die zu testende Sequenz integriert worden ist. Die Testsequenz wird dabei so gewählt, daß sie eine mögliche antivirale Wirkung gegenüber einem zweiten Virus besitzt, welches einige Tage nach Inokulation des cDNA-Klons auf dieselbe Pflanze abgerieben wird. Ein mögliches antivirales Potential sollte sich schließlich daran ablesen lassen, ob sich eine durch das zweite Virus verursachte Infektion etablieren kann oder nicht.

Auf diesen Grundlagen sollten schließlich verschiedene Vektorsysteme miteinander verglichen werden.

## B. Material und Methoden

### 1. Allgemeines Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
AIMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
asRNA	antisense RNA
ATP	Adenosintriphosphat
avr-Gen	Avirulenz-Gen
BaMV	<i>Bamboo mosaic virus</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
BSBV	<i>Beet soilborne virus</i>
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cb	CymMV
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CIYVV	<i>Clover yellow vein virus</i>
cm	Zentimeter
cp	<i>Coatprotein</i> ; Hüllprotein
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Cytidintriphosphat
cy	CIYVV
CymMV	<i>Cymbidium mosaic virus</i>
D	Asparaginsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	<i>days post inoculation</i> ; Tage nach Inokulation
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskop
et al.	et alii; und andere
F	Phenylalanin
FMDV	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>

FoMV	<i>Foxtail mosaic virus</i>
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanidintriphosphat
h	Stunden
HDR	<i>homology-dependent resistance</i>
HR	Hypersensitivitätsreaktion
IC-RT-PCR	Immunocapture-Reverse Transkriptase-PCR
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
ISEM	<i>Immunsorbent electron microscopy</i>
JGMV	<i>Johnsongrass mosaic virus</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
kV	Kilovolt
L	Leucin
l	Liter
M	Marker
M	molar
MCS	<i>Multicloning site</i>
$\mu$ F	Mikrofarad
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
mM	millimolar
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
N.	<i>Nicotiana</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
nos	Nopalinsynthetase
Nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
$\Omega$	Ohm
ON	TRV ON
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
ORY	TRV ORY
PAMV	<i>Potato aucuba mosaic virus</i>
PapMV	<i>Papaya mosaic virus</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PCV	<i>Peanut clump virus</i>
PEBV	<i>Pea early-browning virus</i>
PepRSV	<i>Pepper ringspot virus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PK	Positivkontrolle
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>

psi	<i>pond per square-inch</i>
PSLV	<i>Poa semilatifolia virus</i>
PTGS	<i>post-transcriptional gene silencing</i>
px	PVX
PVX	<i>Potato virus X</i>
py	PVY
PVY	<i>Potato virus Y</i>
R	Arginin
R-Gen	Resistenz-Gen
RIP	Ribosomen-inaktivierende Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
S	Serin
SBWMV	<i>Soilborne wheat mosaic virus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEL	<i>size exclusion limit</i>
SPFMV	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>
te	TEV
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TGB	<i>Triple gene block</i>
TGBp	<i>Triple gene block</i> -Protein
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
TRV ON	TRV-Isolat aus Zwiebel
TRV ORY	TRV-Isolat ‚Oregon Yellow‘
TRV SP	TRV-Isolat aus Spinat
U	unit; Einheit
UTP	Uraciltriphosphat
UV-Licht	Ultraviolette Licht
V	Valin
V	Volt
var.	Variation
VLP	<i>virus-like particle</i> ; virusähnliches Partikel
Vol.	Volumen
W	Tryptophan
WCIMV	<i>White clover mosaic virus</i>
WK	Wasserkontrolle
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Y	Tyrosin

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien und Biochemikalien

Es wurden analysenreine Chemikalien und Biochemikalien der Firmen Ambion, Biozym, Boehringer Mannheim, Calbiochem, Difco, Fluka, Gibco BRL, MBI Fermentas, Merck, New England Biolabs, Promega, Riedel-de-Haën, Roche, Serva, Sigma, Stratagene und TCM Bioproducts verwendet.

### 2.2. Kits

„Jetsorb Gel Extraction Kit“	Genomed
„Nucleobond AX®“	Macherey-Nagel
„NucleoSpin® Extract 2 in 1“	Macherey-Nagel
„QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“	Stratagene
„RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems“	Promega
„RNeasy® Plant Mini Kit“	QIAGEN

### 2.3. Enzyme

Alkalische Phosphatasen	CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) von New England Biolabs CIAP for enzyme immunoassay von Boehringer Mannheim
DNA-Polymerasen	Taq-Polymerase von Gibco BRL PfuTurbo™ von Stratagene
Lysozym	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim, Gibco BRL, MBI Fermentas, New England Biolabs
Reverse Transkriptase	Superscript II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transkriptase von Gibco BRL
RNA-Polymerase	SP6 und T7 RNA-Polymerase von Promega
RNase A	Boehringer Mannheim
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas

## 2.4. Größenstandards

GeneRuler™

100 bp DNA Ladder Plus

MBI Fermentas

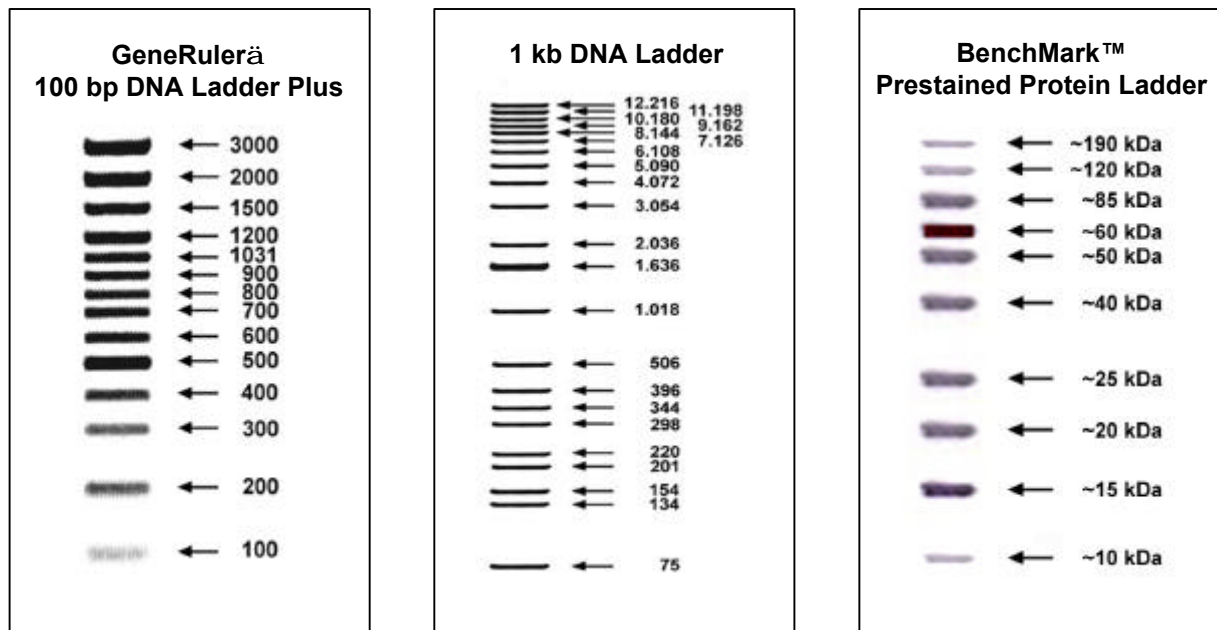
1 kb DNA Ladder

Gibco BRL

BenchMark™

Prestained Protein Ladder

Gibco BRL



## 2.5. Synthetische Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden über MWG Biotech bezogen.

### 2.5.1. Synthetische Oligonukleotide allgemein

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Herkunft
35 sis	tgatatctccactgacgtaagg	sense	CaMV 35 s-Promotor
CAPA	tcaacacatgagcgaaaccc	antisense	Polyadenylierungssignal aus CaMV
SP6	cactatagaataactcaagct	sense	SP6-Promotor aus pGEM-T
T7	taatacgactcactatagg	antisense	T7-Promotor aus pGEM-T

### 2.5.2. CIYVV-Hüllproteingen-spezifische Oligonukleotide

Alle CIYVV-spezifischen Oligonukleotide basieren auf der CIYVV-Sequenz aus pCIYVV (Takahashi et al., 1997).

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
cy cp 1	<u>ggcgcgc</u> catggacagccagatgaaattgtt	sense	9003 - 9023	mit AscI-Site und Startcodon
cy cp 2	<u>ggcgcgc</u> caaaatcgtgtccagcaa	antisense	9843 - 9826	mit AscI-Site



### 2.5.3. CymMV-spezifische Oligonukleotide

Alle CymMV-spezifischen Oligonukleotide basieren auf der CymMV-Sequenz aus pCymMV (Yu and Wong, 1998).

#### a) Allgemein

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
cb 1	aaacctgatgtccgtcgc	sense	5751 - 5766	
cb 2	ttccacaccacttttgcg	antisense	5848 - 5831	
cb 3	<u>catatggg</u> taattttgatggagc	sense	4320 - 4339	mit NdeI-Site
cb 4	<u>ggatcc</u> gaattcgagctcggtac	antisense	6278 - 6261	in Vektorsequenz des pCymMV; mit BamHI-Site

#### b) Oligonukleotide zur Einführung einer Ascl-Restriktionsschnittstelle in pCymMV

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Bemerkungen
cb mut 1	<u>cagtcgggcgcgc</u> ccatgggtaaa ggagaagaacttt	sense	5'-Sequenz des GFP mit PvuII- und Ascl-Site
cb mut 2	<u>cagctggcgcaggg</u> taggttca ccccagggttgactcg	antisense	3'-Sequenz des FMDV P2A aus pPVX P2A mit veränderter 5'-Sequenz des CymMV-Hüllproteins

#### c) 10k-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
cb 10k 1	<u>ggcgcgc</u> catgctaggtacccgaaatc	sense	5203 - 5223	mit Ascl-Site
cb 10k 2	<u>ggcgcgc</u> catttcaaattatgtgtaactaa	antisense	5476 - 5452	mit Ascl-Site
cb 10k 4	<u>ggcgcgc</u> ctagtaatagacgccccgtc	antisense	5389 - 5371	mit Ascl-Site
cb 10k 5	<u>ggcgcgc</u> catggacggggcgtctattacta	sense	5371 - 5389	mit Ascl-Site

#### d) Hüllproteingen-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
cb cp1	<u>ggcgcgc</u> catgggagagcccactcc	sense	5481 - 5497	mit Ascl-Site
cb cp2	<u>ggcgcgc</u> cattcagtaggggggtgcagg	antisense	6150 - 6132	mit Ascl-Site

### 2.5.4. GFP-spezifische Oligonukleotide

Alle GFP-spezifischen Oligonukleotide basieren auf der Sequenz des mGFP4 aus pUC19 mGFP4 (Haseloff et al., 1997).

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
GFP 1	<u>ggcgcgc</u> catgggtaaaggagaagaacttt	sense	1 - 22	mit Ascl-Site
GFP 2	<u>ggcgcgc</u> cttattgtatagttcatccatgcc	antisense	717 - 694	mit Ascl-Site und Stopcodon
GFP 3	<u>ggcgcgc</u> cattgtatagttcatccatgcc	antisense	714 - 694	mit Ascl-Site ohne Stopcodon
GFP 4	<u>cggccggcgcgc</u> ccatgggtaaaggagaagaacttt	sense	1 - 22	mit EagI- und Ascl-Site
GFP 5	<u>tccggaggcgcgc</u> cattgtatagttcatccatgcc	antisense	715 - 694	mit BspEI- und Ascl-Site

### 2.5.5. PVX-spezifische Oligonukleotide

Alle PVX-spezifischen Oligonukleotide basieren auf den PVX-Sequenzen aus pPVX P2A (Oparka et al., 1999) und pPVX 201 (Baulcombe et al., 1995).

#### a) Allgemein

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
px 1	ccgttttgctactgactttg	sense	5400 - 5419	
P2A 1	ggatcctcaccaggggttgactcgacgtctccg ccagctt	antisense	5747 - 5715	mit BamHI-Site, Nukleotidaustausch und Stopcodon
px 5	ggcgcgcctatgtccggatctagaaatttga	sense	5688 - 5707	mit Ascl-Site und Startcodon
px 2	tttggttagtgaggtagttga	antisense	5785 - 5763	
px 3	atttatattatcatacaatcaaacc	antisense	6521 - 6487	

#### b) Oligonukleotide für gerichtete Mutagenese des pPVX 201

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
px mut 1	gcaccagctagcatggcgcgcctatctgcgcgcg	sense	5656 - 5690	Mutageneseprimer zur Einführung einer Ascl-Site; mit NheI-Site

#### c) 166k-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
px 166k 1	ggcgcgcctatggccaaagtgcgc	sense	85 - 99	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 2	ggcgcgcctgttcgggtgagtgttt	antisense	658 - 641	mit Ascl-Site
px 166k 3	ggcgcgcctatggaaagcactcaccg	sense	637 - 654	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 4	ggcgcgcctaatcggaaggaactcc	antisense	1174 - 1158	mit Ascl-Site
px 166k 5	ggcgcgcctatggagttccttgccca	sense	1156 - 1172	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 6	ggcgcgcctgggtattgccccat	antisense	1753 - 1738	mit Ascl-Site
px 166k 7	ggcgcgcctatggggcaataccca	sense	1738 - 1753	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 8	ggcgcgccttctgttaagtactcgcc	antisense	2239 - 2221	mit Ascl-Site
px 166k 9	ggcgcgcctatggcgagtacttaacaggaa	sense	2221 - 2239	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 10	ggcgcgccttcttcttctcatccga	antisense	2812 - 2794	mit Ascl-Site
px 166k 11	ggcgcgcctatgtcggatgagaagagaaagc	sense	2794 - 2812	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 12	ggcgcgccttcttgggcaaaccat	antisense	3424 - 3406	mit Ascl-Site
px 166k 13	ggcgcgcctatgggttgcccaaagagc	sense	3406 - 3424	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 14	ggcgcgcctcacctcaaattgcagcat	antisense	3862 - 3844	mit Ascl-Site
px 166k 15	ggcgcgcctatgtctgaatttgagggtgc	sense	3844 - 3862	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 16	ggcgcgcctaaagaaagttctgaggcg	antisense	4453 - 4435	mit Ascl-Site

px 166k 17	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> acagtacagttgcaggaat	sense	846 - 865	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 18	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> ccagcttatgcgg	sense	1474 - 1489	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 19	<u>ggcgcgccttctt</u> gtgaagcaatcaagc	antisense	1474 - 1455	mit Ascl-Site
px 166k 20	<u>ggcgcgcgcgtccttc</u> gatgacttgttgc	antisense	1933 - 1914	mit Ascl-Site
px 166k 21	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> ttcaagacctctgaaaag	sense	2428 - 2448	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 22	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> caagcactcagggagtacg	sense	3058 - 3076	mit Ascl-Site und Startcodon
px 166k 23	<u>ggcgcgcgcgttctctc</u> accactgataggaa	antisense	3058 - 3037	mit Ascl-Site
px 166k 24	<u>ggcgcgcgcgtctga</u> accatcgcatgtac	antisense	3700 - 3681	mit Ascl-Site

d) 25k-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
px 25k 1	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> gatattctcatcagtagtttg	sense	4486 - 4509	mit Ascl-Site und Startcodon
px 25k 2	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> tccctgcgcgg	antisense	5164 - 5151	mit Ascl-Site
px 25k 3	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> gacaacaccacaaggaactca	sense	4744 - 4764	mit Ascl-Site und Startcodon
px 25k 4	<u>ggcgcgcgcagttcctt</u> gtggtgttgc	antisense	4764 - 4744	mit Ascl-Site
px 25k 5	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> aggaaagtggcagatttgat	sense	4852 - 4871	mit Ascl-Site und Startcodon
px 25k 6	<u>ggcgcgccttg</u> gacagtgtgtctc	antisense	5005 - 4987	mit Ascl-Site

e) 12k-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
px 12k 1	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> tccgcgcaggg	sense	5147 - 5160	mit Ascl-Site und Startcodon
px 12k 2	<u>ggcgcgc</u> caatgactgctatgattgtacca	antisense	5492 - 5470	mit Ascl-Site
px 12k 3	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> tacagagacggcaccaaag	sense	5309 - 5327	mit Ascl-Site und Startcodon
px 12k 4	<u>ggcgcgcctt</u> gtgcccgtctctgta	antisense	5327 - 5309	mit Ascl-Site

f) 8k-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
px 8k 1	<u>ggcgcgc</u> <b>catg</b> gaagtaaatacatatctcaacg	sense	5427 - 5451	mit Ascl-Site und Startcodon
px 8k 2	<u>ggcgcgc</u> caatggaaacttaaccgttaa	antisense	5637 - 5617	mit Ascl-Site
px 8k 3	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> actggggaatcaatcacag	sense	5536 - 5553	mit Ascl-Site und Startcodon
px 8k 4	<u>ggcgcgc</u> cctgtgattgattccccagt	antisense	5553 - 5536	mit Ascl-Site
px 8k 5	<u>ggcgcgc</u> caaggttcagtcctcactaagg	antisense	5520 - 5500	mit Ascl-Site
px 8k 6	<u>ggcgcgccc</u> <b>atg</b> tgtgtcatcaagattactggg	sense	5520 - 5540	mit Ascl-Site und Startcodon
px 8k 7	<u>ggcgcgc</u> <b>catg</b> ctacacgcaataactactgtg	sense	5445 - 5465	mit Ascl-Site und Startcodon
px 8k 8	<u>ggcgcgc</u> cctgcaagccaacactgtga	antisense	5565 - 5548	mit Ascl-Site
px 8k 9	<u>ggcgcgc</u> ccactgtgattgattcccc	antisense	5556 - 5538	mit Ascl-Site

px 8k 10	<u>ggcgcgcc</u> ttgattccccagtaatcttg	antisense	5547 - 5528	mit Ascl-Site
px 8k 11	<u>ggcgcgccc</u> agtaatcttgatgacaca	antisense	5540 - 5520	mit Ascl-Site
px 8k 12	<u>ggcgcgcc</u> taatcttgatgacacaaggttc	antisense	5535 - 5514	mit Ascl-Site
px 8k 13	<u>ggcgcgcc</u> tgatgacacaaggttcagtc	antisense	5529 - 5509	mit Ascl-Site
px 8k 14	<u>ggcgcgcc</u> <u>cgcc</u> <b>atg</b> tgtgtcatcaagattactggg	sense	5520 - 5540	mit Ascl-Site und Startcodon
px 8k 15	<u>ccatgga</u> agtaaatacatatctcaacg	sense	5427 - 5451	mit NcoI-Site
px 8k 16	<u>ggatcct</u> <b>cat</b> gtgattgattccccagtaa	antisense	5553 - 5534	mit BamHI-Site und Stopcodon
px 8k 17	<u>ggcgcgcc</u> tgatgattccccagtaatct	antisense	5550 - 5530	mit Ascl-Site
px 8k 18	<u>ggcgcgcc</u> attccccagtaatcttgatga	antisense	5544 - 5524	mit Ascl-Site

### g) Hüllproteingen-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
px cp 1	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> tcagcaccagctagca	sense	5650 - 5668	mit Ascl-Site und Startcodon
px cp 2	<u>ggcgcgcc</u> atggtggtgtagagtgacaa	antisense	6361 - 6341	mit Ascl-Site
px cp 3	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> cagcccatagggtcaacta	sense	5763 - 5781	mit Ascl-Site und Startcodon
px cp 4	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> actaccacaaaaactgcagg	sense	5787 - 5806	mit Ascl-Site und Startcodon
px cp 5	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> actcctgccacagcttca	sense	5811 - 5828	mit Ascl-Site und Startcodon
px cp 6	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> ttcaccatcccggatg	sense	5835 - 5850	mit Ascl-Site und Startcodon
px cp 7	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> tttagtacagcccgtgcc	sense	5859 - 5876	mit Ascl-Site und Startcodon

### 2.5.6. PVY-Hüllproteingen-spezifische Oligonukleotide

Alle PVY-spezifischen Oligonukleotide basieren auf der PVY-Sequenz nach Robaglia et al. (1989).

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
py cp 1	<u>ggcgcgcc</u> ggaaatgacacaatcgatgc	sense	8552 - 8591	mit Ascl-Site
py cp 2	<u>ggcgcgcc</u> acatgttcttcaactccaagtaga	antisense	9373 - 9351	mit Ascl-Site
py cp 3	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> ggaaatgacacaatcgatgc	sense	8552 - 8591	mit Ascl-Site und Startcodon
py cp 4	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> actaaaaaggatgcaaaacaag	sense	8602 - 8623	mit Ascl-Site und Startcodon
py cp 5	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> agcattcaaccaaactctcaa	sense	8632 - 8651	mit Ascl-Site und Startcodon
py cp 6	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> aaggaaaaggacgtgaatgt	sense	8659 - 8688	mit Ascl-Site und Startcodon
py cp 7	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> gacgtgaatgttgaacatc	sense	8668 - 8687	mit Ascl-Site und Startcodon
py cp 8	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> aattgttgaacatctggaact	sense	8674 - 8694	mit Ascl-Site und Startcodon
py cp 9	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> ggaactcatactgtgccacg	sense	8689 - 8708	mit Ascl-Site und Startcodon
py cp11	<u>ggcgcgcc</u> tgttttctctgtgtactaatg	antisense	9307 - 9285	mit Ascl-Site
py cp 12	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> actcatactgtgccacgaatt	sense	8693 - 8712	mit Ascl-Site und Startcodon

py cp 13	<u>ggcgcgc</u> <b>catg</b> cgaattaaagctatcacgtcc	sense	8707 - 8727	mit Ascl-Site und Startcodon
py cp 14	<u>ggcgcgc</u> <b>catg</b> aaaatgcccaagagtaaagggtgca	sense	8731 - 8757	mit Ascl-Site und Startcodon
py cp 15	<u>ggcgcgc</u> <b>cct</b> taccatccaatccgaaaag	antisense	9282 - 9264	mit Ascl-Site
py cp 16	<u>ggcgcgc</u> <b>caa</b> agtcgagattgagctgatt	antisense	9268 - 9248	mit Ascl-Site
py cp 17	<u>ggcgcgc</u> <b>cctt</b> cctctgtgtactaatgcc	antisense	9304 - 9283	mit Ascl-Site
py cp 18	<u>ggcgcgc</u> <b>ccc</b> ctctgtgtactaatgccac	antisense	9301 - 9281	mit Ascl-Site
py cp 19	<u>ggcgcgc</u> <b>cctt</b> gtgtactaatgccacat	antisense	9298 - 9278	mit Ascl-Site
py cp 20	<u>ggcgcgc</u> <b>cgt</b> gtactaatgccacatcc	antisense	9295 - 9276	mit Ascl-Site
py cp 21	<u>ggcgcgc</u> <b>c</b> tactaatgccacatccaat	antisense	9292 - 9273	mit Ascl-Site
py cp 22	<u>ggcgcgc</u> <b>cta</b> atgccacatccaatcc	antisense	9289 - 9271	mit Ascl-Site
py cp 23	<u>ggcgcgc</u> <b>cct</b> gccacatccaatccg	antisense	9286 - 9270	mit Ascl-Site
py cp 24	<u>catatg</u> ggaaatgacacaatcgatgc	sense	8552 - 8591	mit NdeI-Site und Startcodon
py cp 25	<u>ggatcct</u> <b>ca</b> catgttcttactccaagt	antisense	9375 - 9354	mit BamHI-Site und Stopcodon
py cp 26	<u>ggatcct</u> <b>ca</b> gccacatccaatccga	antisense	9285 - 9269	mit BamHI-Site und Stopcodon
py cp 27	<u>ggatcct</u> <b>ca</b> accatccaatccgaaaagt	antisense	9282 - 9264	mit BamHI-Site und Stopcodon
py cp 28	<u>catatg</u> ggaactcactatgtgccacg	sense	8689 - 8708	mit NdeI-Site und Startcodon
py cp 29	<u>catatg</u> actcactatgtgccacgaatt	sense	8693 - 8712	mit NdeI-Site und Startcodon

### 2.5.7. TEV-spezifische Oligonukleotide

Alle TEV-spezifischen Oligonukleotide basieren auf der TEV-Sequenz aus pTEV H/C (Blanc et al., 1999).

#### a) Allgemein

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position
te 1	tatggcgagaggaaaagg	sense	790 - 807
te 2	tttctcccgaactcacct	antisense	1279 - 1262
te 3	gctatcgctcgtaaattggtg	antisense	143 - 124
te 4	tctcattacttaggcgaacg	sense	9434 - 9453
te 9	agcgagggtcaagagattt	sense	732 - 750

#### b) Oligonukleotide für gerichtete Mutagenese des pTEV H/C

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
te mut 1	caccatcaccatcacg <u>ggcgcgc</u> ctctgaggccttcgag	sense	1066 - 1104	Mutageneseprimer zur Einführung einer Ascl-Site
te mut 2	ctcgaaggcctcagag <u>ggcgcgc</u> cccgatgatggtgatggtg	antisense	1104 - 1066	Mutageneseprimer zur Einführung einer Ascl-Site

## c) Hüllproteingen-spezifische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
te cp 1	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> agtggcactgtggatgct	sense	8518 - 8535	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 2	<u>ggcgcgcc</u> actggcggaccctaa	antisense	9307 - 9292	mit Ascl-Site
te cp 3	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> gctggtagaagaagatcaa	sense	8545 - 8565	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 4	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> gataaagtcgctgagcagg	sense	8572 - 8590	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 5	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> aaggataggatgttaatgct	sense	8596 - 8616	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 7	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> aatgctggaacttcaggaa	sense	8611 - 8629	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 8	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> ggaacattctcagttccacg	sense	8626 - 8645	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 10	<u>ggcgcgcc</u> tgtcttctctgcagtagcc	antisense	9244 - 9225	mit Ascl-Site
te cp 11	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> acattctcagttccacgaataa	sense	8629 - 8650	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 12	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> cgaataaatgctatggcca	sense	8644 - 8662	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 13	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> cttcaatatccaaggatg	sense	8668 - 8686	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 15	<u>ggcgcgcc</u> ataacctagtctcactgtttcg	antisense	9205 - 9184	mit Ascl-Site
te cp 16	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> ttctcagttccacgaataaatg	sense	8632 - 8653	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 17	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> tcagttccacgaataaatgc	sense	8635 - 8654	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 18	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> gttccacgaataaatgctatg	sense	8638 - 8658	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 19	<u>ggcgcgcc</u> <b>atg</b> ccacgaataaatgctatggc	sense	8641 - 8660	mit Ascl-Site und Startcodon
te cp 21	<u>ggcgcgcc</u> tagctttcatttgcataatgc	antisense	9174 - 9156	mit Ascl-Site
te cp 23	<u>ggcgcgcc</u> gcgcctccctcgctcta	antisense	9157 - 9141	mit Ascl-Site
te cp 24	<u>ggcgcgcc</u> caacaggtgttttgaagttagc	antisense	9141 - 9120	mit Ascl-Site
te cp 25	<u>ggcgcgcc</u> ttttgaagttagctcatagaagt	antisense	9133 - 9110	mit Ascl-Site
te cp 26	<u>ggcgcgcc</u> tagttagctcatagaagtcgaac	antisense	9126 - 9105	mit Ascl-Site
te cp 27	<u>ggcgcgcc</u> catagaagtcgaacgcatag	antisense	9118 - 9099	mit Ascl-Site
te cp 28	<u>ggcgcgcc</u> cgaacgcatagcgtgac	antisense	9109 - 9093	mit Ascl-Site
te cp 31	<u>catatg</u> agtggcactgtggatgct	sense	8518 - 8535	mit NdeI-Site und Startcodon
te cp 32	<u>ggatcct</u> <b>c</b> actggcggaccct	antisense	9309 - 9294	mit BamHI-Site und Stopcodon
te cp 33	<u>catatg</u> tcagttccacgaataaatgc	sense	8635 - 8654	mit NdeI-Site und Startcodon
te cp 34	<u>catatg</u> gttccacgaataaatgctatg	sense	8638 - 8658	mit NdeI-Site und Startcodon
te cp 35	<u>ggcgcgcc</u> caggtgttttgaagttagctc	antisense	9139 - 9118	mit Ascl-Site
te cp 36	<u>ggcgcgcc</u> gtgttttgaagttagctcataga	antisense	9136 - 9113	mit Ascl-Site
te cp 38	<u>ggatcct</u> <b>ca</b> aggtgttttgaagttagctc	antisense	9138 - 9118	mit BamHI-Site und Stopcodon
te cp 39	<u>ggatcct</u> <b>cat</b> gttttgaagttagctcataga	antisense	9135 - 9113	mit BamHI-Site und Stopcodon

### 2.5.8. TRV-spezifische Oligonukleotide

#### a) TRV ON-Hüllproteingen-spezifische Oligonukleotide

Alle TRV ON-spezifischen Oligonukleotide basieren auf der TRV ON-Sequenz nach Uhde et al. (1998).

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
ON cp 1	<u>ggcgcg</u> cccatggctgggacgtatgg	sense	710 - 726	mit Ascl-Site
ON cp 2	<u>ggcgcg</u> ccaaggattcggaccacgtc	antisense	1330 - 1313	mit Ascl-Site
ON cp 3	<u>ggcgcg</u> cccatgtatggagagtctttgaagga	sense	721 - 742	mit Ascl-Site und Startcodon
ON cp 4	<u>ggcgcg</u> ccccacttcagactgtattctct	antisense	1253 - 1232	mit Ascl-Site
ON cp 5	<u>ggcgcg</u> cccatg <b>cg</b> tggagagtctttgaagga	sense	721 - 742	mit Ascl-Site, Startcodon und zwei Austauschen
ON cp 6	<u>ggcgcg</u> cccatg <b>g</b> ggagagtctttgaaggaaag	sense	725 - 745	mit Ascl-Site und Startcodon
ON cp 7	<u>ggcgcg</u> ccccacttcagactgtattctctt <b>cg</b> aaat	antisense	1253 - 1224	mit Ascl-Site und zwei Austauschen
ON cp 8	<u>ggcgcg</u> ccccacttcagactgtattctctt <b>g</b> caaatg	antisense	1253 - 1224	mit Ascl-Site und einem Austausch
ON cp 9	<u>ggcgcg</u> ccacttcagactgtattctcttcaa	antisense	1250 - 1227	mit Ascl-Site
ON cp 10	<u>ggcgcg</u> ccctcagactgtattctcttcaaatg	antisense	1247 - 1224	mit Ascl-Site
ON cp 11	<u>ggcgcg</u> cccgactgtattctcttcaaatgttc	antisense	1244 - 1221	mit Ascl-Site
ON cp 12	<u>catatg</u> gctgggacgtatgg	sense	710 - 726	mit NdeI-Site
ON cp 13	<u>ccatg</u> gctgggacgtatgg	sense	710 - 726	mit NcoI-Site
ON cp 14	<u>ggatc</u> ctcaaaggattcggaccacg	antisense	1333 - 1315	mit BamHI-Site; mit Stopcodon
ON cp 15	<u>ggcgcg</u> ccatggctgggacgt <b>tt</b> ggag	sense	710 - 728	mit Ascl-Site und einem Austausch
ON cp 16	<u>ggcgcg</u> ccatggctgggacg <b>g</b> ctggag	sense	710 - 728	mit Ascl-Site und zwei Austauschen
ON cp 17	<u>ggcgcg</u> ccatggctgggacgt <b>ct</b> ggag	sense	710 - 728	mit Ascl-Site und einem Austausch
ON cp 18	<u>ggcgcg</u> ccccacttcagactgtattctct <b>at</b> caaatg	antisense	1253 - 1224	mit Ascl-Site und einem Austausch
ON cp 19	<u>ggcgcg</u> ccccacttc <b>a</b> actgtattctct	antisense	1253 - 1232	mit Ascl-Site und einem Austausch
ON cp 20	<u>ggcgcg</u> cccc <b>gc</b> cttcagactgtattctct	antisense	1253 - 1232	mit Ascl-Site und zwei Austauschen
ON cp 21	<u>ggatc</u> ct <b>ca</b> actgtattctcttcaaatgttc	antisense	1244 - 1221	mit BamHI-Site und Stopcodon
ON cp 22	<u>ggatc</u> ct <b>ca</b> ccacttcagactgtattctctt <b>cg</b> aaatg	antisense	1253 - 1224	mit BamHI-Site und zwei Austausch; mit Stop
ON cp 23	<u>catatg</u> <b>cg</b> tggagagtctttgaagga	sense	721 - 742	mit BamHI-Site, Startcodon und zwei Austauschen
ON cp 24	<u>catatg</u> gggagagtctttgaaggaaag	sense	725 - 745	mit BamHI-Site und Startcodon
ON cp 25	<u>ggcgcg</u> cccatggctgggacgt <b>ggg</b> gagag	sense	710 - 726	mit Ascl-Site und zwei Austauschen
ON cp 26	<u>ggcgcg</u> cccc <b>at</b> acttcagactgtattctct	antisense	1253 - 1232	mit Ascl-Site und zwei Austauschen
ON cp TEV	<u>ggcgcg</u> cccatg <b>agcgaccatcaccatcaccatc</b> <b>acggg</b> cgagcagctgggacgtatggagag	sense	713 - 730	mit Ascl-Site, Sequenz aus pTEV H/C

b) TRV ORY-Hüllproteingen-spezifische Oligonukleotide

Alle TRV ORY-spezifischen Oligonukleotide basieren auf der Sequenz nach Sudarshana and Berger (1998).

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Orientierung	Position	Bemerkungen
ORY cp 1	ggcgcgccatgacagacggatgtacgatg	sense	522 - 543	mit Ascl-Site
ORY cp 2	ggcgcgccaggattcggacgc	antisense	1122 - 1109	mit Ascl-Site
ORY cp 3	ggcgcgccatgtacgatgaggagtttgat	sense	534 - 554	mit Ascl-Site und Startcodon
ORY cp 4	ggcgcgccctccacctagtgtgtacgattt	antisense	1076 - 1056	mit Ascl-Site

## 2.6. Plasmide

### 2.6.1. Klonierungs- und Expressionsvektoren

a) pGEM-T (Firmenvorschrift von Promega)

pGEM-T ist ein spezieller Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten in *E. coli*.

Er wird von der Firma Promega in linearisierter Form angeboten und kann somit direkt zur Ligation eingesetzt werden. An beiden Enden wurde ein 3'-terminales Thymidin angefügt. Dies verhindert zum einen eine Religation des Vektors und ermöglicht zum anderen die einfache Klonierung von PCR-Produkten, die mit DNA-Polymerasen erzeugt wurden, welche – unabhängig von der Sequenz der Matrizen-DNA – an die 3'-Enden der PCR-Fragmente ein Adenosin anknüpfen.

Darüber hinaus eignet sich pGEM-T zur Blau-Weiß-Selektion, was die Identifizierung von Rekombinanten zusätzlich erleichtert.

b) pRT 103 (Töpfer et al., 1993)

Bei dem Vektor pRT 103 handelt es sich um ein Derivat des Expressionsvektors pRT 100 (Töpfer et al., 1987). Die Vektoren der pRT-Reihe zeichnen sich durch den Besitz einer Expressionskassette bestehend aus CaMV 35S RNA-Promotor, *multicloning site* und CaMV-Polyadenylierungssignal aus und eignen sich damit zur transienten Expression von Genen in Pflanzen.

c) pSBET b (Schenk et al., 1995)

Der Vektor pSBET b dient als Expressionsvektor in *E. coli*.

d) pUC19 mGFP4 (Haseloff et al., 1997)

Der auf pUC19 basierende Vektor trägt eine Expressionskassette, die den 35S RNA-Promotor aus CaMV, das GFP (*green fluorescent protein*)-Gen und ein Polyadenylierungssignal, ebenfalls aus CaMV, umfasst. Mit Hilfe dieses Konstrukts ist eine transiente Expression des GFP in Pflanzen möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit diente dieser Vektor allerdings lediglich als Quelle für die Gensequenz des mGFP4.



### 2.6.2. Infektiöse virale cDNA-Klone

#### a) pCIYVV Ascl/Nla GFP (Korowski, 2001)

Dieses Konstrukt basiert auf dem infektiösen viralen cDNA-Klon pCIYVV von Takahashi et al. (1997). Es handelt sich hierbei um die ganzlängige cDNA-Sequenz des Potyvirus *Clover yellow vein virus* (CIYVV) mit vorgeschaltetem CaMV 35S RNA-Promotor und abschließendem nos(Nopalinsynthetase-Gen)-Terminator, wodurch eine Transkription der Virussequenz nach Inokulation einer geeigneten Wirtspflanze direkt *in vivo* ermöglicht wird.

Ausgehend von dem Basiskonstrukt pCIYVV wurde zunächst eine Ascl-Restriktionsschnittstelle und eine zusätzliche Nla-Protease-Erkennungssequenz zwischen P1 und HC-Pro der CIYVV-Sequenz eingeführt (pCIYVV Ascl/Nla; Tschauder, 2000). Diese Modifikation erlaubt die Insertion beliebiger Fremdsequenzen über die Ascl-Schnittstelle und - nach Translation des viralen Polyproteins - eine proteolytische Freisetzung des Fremdproteins durch die viruskodierten Proteasen P1 und Nla.

In dieses Konstrukt wurde über die Ascl-Restriktionsschnittstelle schließlich die Sequenz des mGFP4-Gens integriert (vgl. Abb. 3).

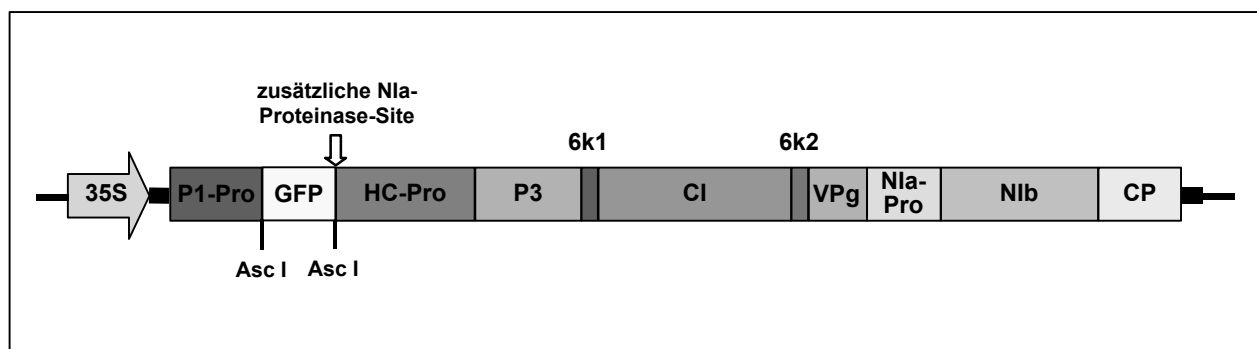


Abb. 3: Schematische Darstellung des infektiösen cDNA-Klons pCIYVV Ascl/Nla GFP

#### b) pCymMV (Yu and Wong, 1998)

Die Grundlage für dieses Konstrukt bildet die cDNA-Sequenz des Potexvirus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV). Die virale Sequenz steht hier unter Kontrolle des T7 RNA-Polymerase Promotors, der eine Transkription der Virussequenz *in vitro* unter Verwendung einer T7 RNA-Polymerase erlaubt (vgl. Abb. 4). Diese Transkripte werden anschließend zur Inokulation einer geeigneten Wirtspflanze verwendet.

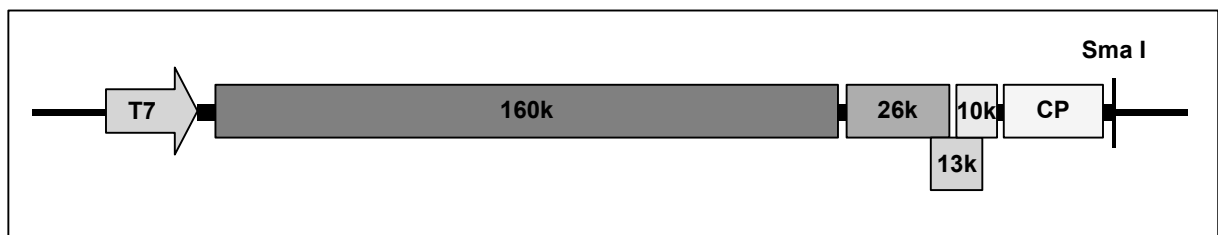


Abb. 4: Schematische Darstellung des infektiösen cDNA-Klons pCymMV

c) pPVX 201 (Baulcombe et al., 1995)

Das Konstrukt pPVX 201 basiert auf der cDNA-Sequenz des Potexvirus *Potato virus X* (PVX). Der viralen Sequenz vorgeschaltet liegt der 35S RNA-Promotor aus CaMV; im Anschluß folgt der nos-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens*, so daß auch hier eine Transkription *in vivo* erfolgen kann.

Um eine Expression von Fremdsequenzen über diesen viralen Vollängenklon zu ermöglichen, wurde die Sequenz des PVX-Hüllprotein-Promotors, welcher die Expression der Hüllprotein-kodierenden subgenomischen RNA steuert, im Bereich zwischen 8k- und Hüllprotein-Gen verdoppelt (vgl. Abb. 5). Hinter diese verdoppelte Promotor-Sequenz können nun über ebenfalls eingeführte Restriktionsschnittstellen Fremdsequenzen mit Start- und Stopcodon kloniert werden, die nach Inokulation des so modifizierten Vollängenklons zusammen mit den viralen Sequenzen in der Wirtspflanze zur Expression gebracht werden.

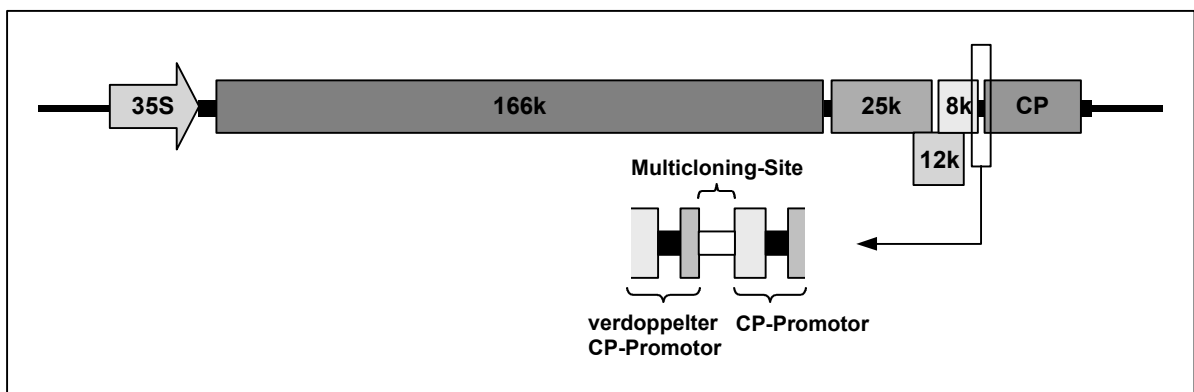


Abb. 5: Schematische Darstellung des infektiösen cDNA-Klons pPVX 201

d) pPVX P2A GFP (Oparka et al., 1999)

Ähnlich wie das zuvor beschriebene Konstrukt pPVX 201 setzt sich auch der Vollängenklon pPVX P2A GFP aus der cDNA-Sequenz des PVX mit vorgeschaltetem CaMV 35S RNA-Promotor und nachgeschaltetem nos-Terminator zusammen. Die Expression einer integrierten Fremdsequenz - in diesem Fall die Sequenz des GFP-Gens - erfolgt hier allerdings nicht über einen verdoppelten Hüllprotein-Promotor. Statt dessen wird die zu exprimierende Fremdsequenz mit Start-, aber ohne Stopcodon direkt zwischen Hüllprotein-Promotor und Hüllproteingen integriert, so daß Fremdgen und PVX-Hüllproteingen ein gemeinsames offenes Leseraster bilden. Um dennoch die Entstehung zweier voneinander unabhängiger Proteine zu gewährleisten, liegt zwischen Fremd- und Hüllproteingen die Sequenz für das Peptid P2A aus dem Picornavirus FMDV (*Foot-and-mouth disease virus*) (vgl. Abb. 6).

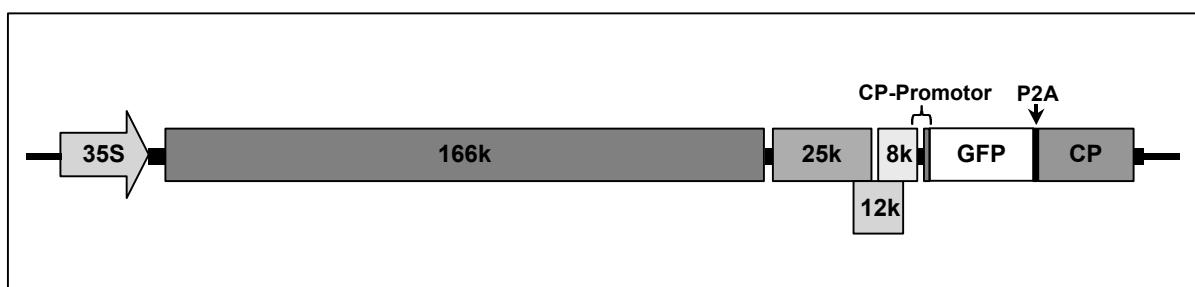


Abb. 6: Schematische Darstellung des infektiösen cDNA-Klons pPVX P2A GFP

P2A besteht lediglich aus 16 Aminosäuren und bewirkt unter nativen Bedingungen auf translationeller Ebene eine Trennung des FMDV-Polypeptids zwischen dem C-Terminus der P2A-Sequenz und dem N-Terminus der dahinterliegenden P2B-Sequenz (Ryan et al., 1991). Versuche mit synthetischen und rekombinanten Polypeptiden zeigten, daß P2A auch außerhalb des FMDV-Systems dazu in der Lage ist, eine Trennung artifizierlicher Polypeptide sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu bewirken. Hierbei entstehen allerdings zusätzlich zu den Einzelproteinen geringe Anteile (~10 %) eines Fusionsproteins aus den beiden durch P2A gekoppelten Proteinen. Dieses Phänomen ist durch eine suboptimale Aktivität des P2A außerhalb des nativen Kontextes zu erklären (Donnelly et al., 2001b).

Ein wichtige Voraussetzung für eine effiziente P2A-Aktivität ist unter anderem ein Prolinrest, der sich direkt an die P2A-Sequenz anschließt (Santa Cruz et al., 1996). Aus diesem Grund beginnt im pPVX P2A GFP die hinter der P2A-Gensequenz liegende PVX-Hüllproteingen-Sequenz erst mit dem vierten Codon, welches für das erste Prolin innerhalb des PVX-Hüllproteins kodiert.

Die Expression einer Fremdsequenz über das pPVX P2A-System resultiert somit in folgenden Expressionsprodukten:

1. Fremdprotein mit 19 zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus
2. N-terminal um drei Aminosäuren verkürztes PVX-Hüllprotein
3. Fusionsprotein aus Fremdprotein, P2A und PVX-Hüllprotein zu geringen Teilen

e) pTEV H/C (Blanc et al., 1999)

Der Vollängenklon pTEV H/C umfasst die virale cDNA des Potyvirus *Tobacco etch virus* (TEV) unter der Kontrolle des SP6 RNA-Polymerase Promotors, der die Herstellung von *in vitro*-Transkripten mittels der SP6 RNA-Polymerase aus *E. coli* erlaubt. Um die Expression von Fremdsequenzen über dieses Vektorsystem zu ermöglichen, wurde im 5'-terminalen Bereich des HC-Protease-Gens ein 6xHistidin-Tag, eine *cloning site* mit MluI- und StuI-Restriktionsschnittstelle und eine zusätzliche Erkennungssequenz für die viruskodierte NIa-Protease eingefügt (vgl. Abb. 7). Durch die Einführung dieser Modifikationen wurden 15 N-terminale Aminosäuren der HC-Protease eliminiert. Der Verlust dieser Aminosäuren führt dazu, daß das aus diesem Vollängenklon entstehende Virus nicht mehr Blattlaus-übertragbar ist (Dolja, persönliche Mitteilung).

Wird eine Fremdsequenz im richtigen Leseraster und ohne Stopcodon über die beiden zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen in die virale Sequenz integriert, so wird sie zunächst als Teil des viralen Polypeptids exprimiert und anschließend durch die Aktivität der P1-Protease und der NIa-Protease freigesetzt. Das freie Fremdprotein besitzt allerdings sowohl N- als auch C-terminal zusätzliche Aminosäuren, deren Anzahl je nach verwendeter Restriktionsschnittstelle zwischen 8 bis 13 AS am N-Terminus und 6 bis 11 AS am C-Terminus beträgt.

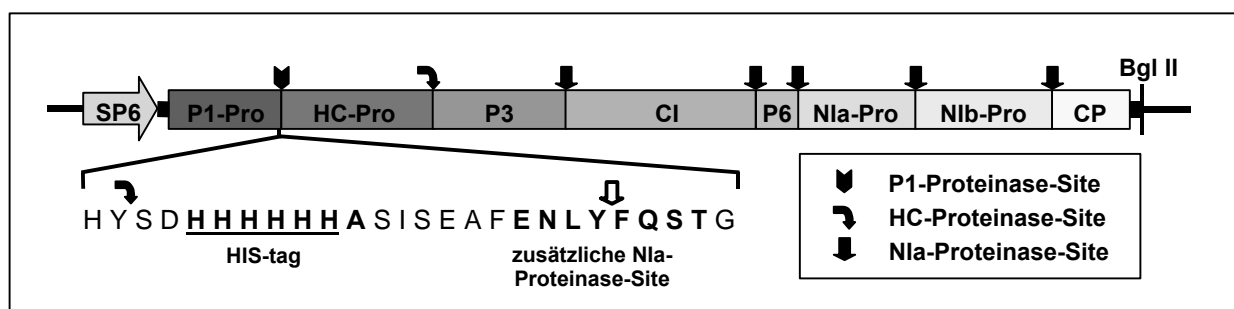


Abb. 7: Schematische Darstellung des infektiösen cDNA-Klons pTEV H/C  
Die Aminosäuresequenz des veränderten Bereichs ist herausgestellt.  
Aminosäuren, die von der Wildtypsequenz abweichen, sind fett gedruckt.

Ausgehend von diesen Plasmiden wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Konstrukte hergestellt. Die Beschreibung dieser Konstrukte erfolgt in den entsprechenden Kapiteln.

## 2.7. Bakterienstämme

### *Escherichia coli*

BL21(DE3) F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)  
(Studier and Moffatt, 1986; Studier et al., 1990)

HB2151 K12, ara, Δ(lac-pro), thi/F'proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>ΔM15  
(Hoogenboom et al., 1991)

SCS 110 rpsL (Str<sup>r</sup>) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44  
Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15]

### *Agrobacterium tumefaciens*

GV 3101/pMP90RK Van Larebeke et al. (1974)

## 2.8. Virus-Isolate

### 2.8.1. *Potato virus Y* (PVY)

(Robaglia et al., 1989)

PVY ist der namensgebende Vertreter der Potyvirus-Gruppe. Das Virus bildet lange flexible Partikel (Fäden) mit einer durchschnittlichen Länge von 730 nm und einer Breite von ca. 11 nm. Sein Genom besteht aus einzelsträngiger Plus-Strang-RNA und umfasst ca. 9700 Nukleotide. Die Expression erfolgt in Form eines Polyproteins, das durch die Aktivität verschiedener, viruskodierter Proteasen zu den entsprechenden Einzelproteinen prozessiert wird.

Die Stammhaltung erfolgt durch mechanische Inokulation auf *Nicotiana tabacum*, var. Samsun.

### 2.8.2. *Tobacco rattle virus* (TRV)

(Sudarshana and Berger, 1998; Uhde et al., 1998)

TRV ist der namensgebende Vertreter der Tobravirus-Gruppe. Das Virus bildet starre, stäbchenförmige Partikel von zwei verschiedenen Längen (L-Typ: 180-215 nm; S-Typ: 46-115 nm) und 25 nm Breite. Kennzeichnend ist der 4-5 nm breite Zentralkanal. Das Genom besteht aus einzelsträngiger Plus-Strang-RNA und ist zweigeteilt. Die zwischen den einzelnen Isolaten recht stark konservierte RNA1 besitzt eine Größe von ca. 6.8 kb und findet sich in den langen L-Partikeln. Die RNA2-Sequenz der verschiedenen Isolate ist dagegen sehr unterschiedlich. Sie umfasst zwischen 1.8-4.5 kb und liegt in den kürzeren S-Partikeln vor.

In der vorliegenden Arbeit werden die Isolate TRV ON (Uhde et al., 1998) und TRV ORY (Sudarshana and Berger, 1998) verwendet. Die Stammhaltung beider Isolate erfolgt durch mechanische Inokulation auf *Nicotiana tabacum*, var. Samsun und *Nicotiana clevelandii*.

## 2.9. Immunglobuline

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Immunglobulinen (vgl. Tab. 1) handelt es sich um polyklonale, gegen das jeweilige Viruspartikel gerichtete  $\gamma$ -Globuline. Die Immunglobuline (IgG) und deren AP-Konjugate (IgG-AP) wurden im Labor Koenig hergestellt bzw. von der DSMZ zur Verfügung gestellt.

Tab. 1 : Herkunft und Spezifität der verwendeten IgGs und deren Verdünnung im ELISA

Antiserum	Antigen	Verdünnung im ELISA	
		IgG	AP-Konjugat
AS-0243	Viruspartikel des CIYVV	1 : 1000	1 : 1000
AS-0493	Viruspartikel des CymMV	1 : 2000	1 : 2000
133	Viruspartikel des PVX	1 : 1500	1 : 1000
AS-0137/403	Viruspartikel des PVY	1 : 1000	1 : 4000
AS-0138	Viruspartikel des TEV	1 : 1000	1 : 1000
817	Viruspartikel des TRV ON	1 : 1000	1 : 1000
988	Viruspartikel des TRV ORY	1 : 300	1 : 300

## 2.10. Pflanzenmaterial

Für die Stammhaltung der verschiedenen Virus-Isolate wird *Nicotiana tabacum* var. Samsun und *Nicotiana clevelandii* verwendet.

Die Inokulation der viralen Vollängenklone bzw. der davon abgeleiteten Konstrukte erfolgt auf entsprechend geeigneten Wirtspflanzen (vgl. B 3.5.2. Tab. 2).

Für die Transformation mit Hilfe der Partikelkanone wird Blattmaterial von *Nicotiana benthamiana* verwendet.

## 2.11. Nährmedien und Antibiotika

### 2.11.1. Allgemeine Medien zur Kultivierung von Bakterien

(modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

#### Medien für *Escherichia coli* :

2xYT flüssig	16 g/l Bacto-Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl pH 7.0 mit NaOH
2xYT fest	2xYT flüssig + 15 g/l Agar
Festmedium zur Blau-Weiß-Selektion	2xYT fest 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 40 mg/l IPTG; 40 mg/l X-Gal

#### Medien für *Agrobacterium tumefaciens* :

LB <sub>mod</sub> -flüssig	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 1 g/l Glucose pH 7.0 mit NaOH
LB <sub>mod</sub> -fest	LB <sub>mod</sub> -flüssig + 15 g/l Agar

### 2.11.2. Stammlösungen Antibiotika

Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Kanamycin	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Spectinomycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Streptomycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

## 3. Methoden

### 3.1. Molekularbiologische Grundtechniken

#### 3.1.1. Sterilisationsverfahren

Medien, Lösungen, Reaktions- und Kulturgefäße werden zur Sterilisation 20-25 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Reaktions- und Kulturgefäße aus Glas oder Metall sowie Mörtel können alternativ bei 180°C für 4 h hitzesterilisiert werden.

Hitzeempfindliche Lösungen, wie z.B. Antibiotika oder Enzymlösungen werden sterilfiltriert.

#### 3.1.2. Kultivierung von Bakterien

(modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

Die Gewinnung von Einzelkolonien erfolgt durch Ausstrich einer Bakteriensuspension auf 2xYT-Festmedium für *E. coli* und LB<sub>mod</sub>-Festmedium für *Agrobacterium tumefaciens*, dem zuvor das bzw. die zur Selektion notwendigen Antibiotika zugesetzt wurden. Die Vermehrung eines Bakterienklons erfolgt durch Anzucht in 2xYT- bzw. LB<sub>mod</sub>-Flüssigmedium mit entsprechender Antibiotika-Zugabe 8-16 h bei 37°C bzw. 28°C und ~150 rpm.

Die Endkonzentration der hier verwendeten Antibiotika beträgt sowohl im Flüssig- als auch im Festmedium 100 µg/ml für Ampicillin, 30 µg/ml für Kanamycin, 50 µg/ml für Spectinomycin und 20 µg/ml für Streptomycin bei *E. coli* bzw. 25 µg/ml für Kanamycin, 100 µg/ml für Spectinomycin und 300 µg/ml für Streptomycin bei *Agrobacterium tumefaciens*.

#### 3.1.3. Alkoholpräzipitation von DNA

(modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

Der wässrigen Lösung werden 1/10 Vol. 3 M Natriumacetatlösung sowie 2 Vol. 100 %iges Ethanol zugegeben. Die DNA wird 2 h bei -20°C ausgefällt und durch anschließende Zentrifugation (15 min bei 13 000 rpm und 4°C) pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, im Vakuum-Rotationsverdampfer getrocknet und in den gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen.

Alternativ können anstelle des 100 %igen Ethanols auch 0.7 Vol. 100 %iges Isopropanol zur Fällung verwendet werden. In diesem Fall schließt sich der Zentrifugationsschritt ohne weitere Inkubation direkt an.

### 3.1.4. Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

(modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

#### Photometrische Messung

Die Konzentration gelöster DNA wird mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie bestimmen. Für doppelsträngige DNA gilt hierbei:  $OD_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml.

Durch zusätzliche Messung der Extinktion bei 230 nm (Polysaccharide) bzw. 280 nm (Proteine) läßt sich darüberhinaus die Reinheit der Nukleinsäurepräparation überprüfen. Bei einer reinen Probe sollten die Werte  $OD_{230}$ ,  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  in einem Verhältnis von 1 : 2 : 1 stehen. Davon abweichende Verhältnisse weisen auf entsprechende Verunreinigungen in der Lösung hin.

#### Abschätzung in einem Agarosegel

Eine weitere Methode, mit der sich der DNA-Gehalt einer Lösung ungefähr bestimmen läßt, ist die Abschätzung über ein Agarosegel. Hierzu wird auf einem Agarosegel ein Aliquot der zu bestimmenden DNA-Lösung neben einer DNA-Probe mit bekannter Konzentration aufgetragen. Nach Auftrennung und Ethidiumbromidfärbung läßt sich die unbekannte DNA-Konzentration durch Vergleich der Leuchtintensität der Banden unter UV-Licht abschätzen.

### 3.1.5. Agarosegelelektrophorese

(modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

#### Lösungen:

Elektrophorese-Puffer (1x TAE)	40 mM Tris-Acetat, pH 7.0; 20 mM Natriumacetat 1 mM EDTA
Ethidiumbromid-Lösung	0.5 ‰
5x Gel-Ladepuffer	0.25 % Bromphenolblau; 25 % Ficoll

Die Agarosegelelektrophorese ist ein biochemisches Verfahren zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von Nukleinsäurefragmenten. Diese Standardmethode der Molekularbiologie macht sich die Eigenschaft der negativ geladenen Nukleinsäuren zunutze, innerhalb einer Gelmatrix unter Anlegen eines elektrischen Feldes in Abhängigkeit von ihrer Größe und Zustandsform in Richtung der Anode zu wandern.

Ein Gemisch verschieden langer Nukleinsäurefragmente läßt sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten leicht auftrennen.

Entscheidend für den effektiven Trennbereich einer Gelmatrix ist die für das Gel verwendete Agarosekonzentration. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wird eine Agarosekonzentration von 0.7 % (eff. Trennbereich: 10-0.8 kb) bis 3 % (eff. Trennbereich: 2-0.1kb) verwendet.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird die entsprechende Menge an Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Die leicht abgekühlte Agaroselösung wird in ein vorbereitetes Gelbett gegossen und der Gelkamm zur Erzeugung der Taschen eingesetzt. Das erstarrte Gel wird in eine Elektrophoresekammer gegeben und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben werden mit 1/5 Vol. 5x Ladepuffer versetzt und in die durch den Gelkamm entstandenen Taschen gefüllt. Parallel hierzu wird ein geeigneter Größenstandard aufgetragen, mit dessen Hilfe sich später die relative Größe

der aufgetrennten Fragmente bestimmen läßt. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgt bei 1-5 Volt/cm Elektrodenabstand.

Nach ausreichendem Gellauf werden die aufgetrennten Fragmente durch 10-15 minütige Inkubation des Gels in 0.5 % Ethidiumbromidlösung angefärbt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und ihre relativen Größen mit Hilfe des Größenstandards bestimmt.

### 3.1.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus Agarosegelen stellt eine Möglichkeit dar, spezifische DNA-Fragmente in gereinigter Form für Klonierungsarbeiten zu gewinnen. Hierfür stehen das „JetSorb Gel Extraction Kit“ von Genomed und das „NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit“ von Macherey-Nagel zur Verfügung.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel (vgl. B 3.1.5.) werden die gewünschten, mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmente unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Die Extraktion der DNA erfolgt nach dem entsprechenden Firmenprotokoll.

Nach der Aufreinigung liegt das DNA-Fragment schließlich gelöst in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  oder TE vor und kann für weitere Klonierungsarbeiten verwendet werden.

### 3.1.7. Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen

Mit Hilfe des „NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit“ von Macherey-Nagel ist es nicht nur möglich, DNA aus Agarosegelen zu gewinnen, sondern auch lineare Plasmid-DNA nach enzymatischen Reaktionen, wie z.B. Dephosphorylierungsreaktionen (vgl. B 3.3.3.) oder Restriktionsspaltungen (vgl. B 3.3.1.), von störenden Reaktionskomponenten zu reinigen.

Der zu reinigende Reaktionsansatz wird lediglich mit TE auf ein Volumen von 100 µl gebracht und laut Firmenprotokoll weiter verarbeitet.

Die gereinigte DNA liegt schließlich gelöst in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  oder TE vor und kann für weitere Klonierungsarbeiten verwendet werden.

## 3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Mullis et al., 1987)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäureabschnitten definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen.

Das Prinzip der PCR beruht auf der enzymatischen Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist die Kenntnis der Sequenz an den Enden des zu vervielfältigenden Abschnittes.

Die PCR besteht aus einer sich immer wiederholenden Abfolge von drei Teilreaktionen:

1. Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNA durch Hitzebehandlung (94°C)
2. Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an die Matrizen-DNA (50-70°C)
3. Synthese der komplementären Stränge durch eine thermostabile DNA-Polymerase (~ 72°C bei *Taq*-Polymerase)

Die Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes erfolgt exponentiell, so daß selbst geringste DNA-Mengen ausreichen, um nach wenigen Zyklen genügend Material für weiterführende Untersuchungen zu liefern.

In der Molekularbiologie spielt die PCR eine entscheidende Rolle bei der Markierung von Sonden, der gezielten Mutagenese, der Klonierung, der Gen-Diagnostik, dem DNA-



Footprinting, usw.. Anwendung findet die PCR allerdings nicht nur in der Molekularbiologie, sondern auch in der Medizin, z.B. zur Diagnostik von genetisch bedingten Krankheiten oder zum Nachweis von Virus- oder Bakterieninfektionen.

#### Lösungen:

10x Taq-Polymerase-Puffer	200 mM Tris-HCl, pH 8.4; 500 mM KCl
10x Reaktionspuffer	100 mM KCl; 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 200 mM Tris-HCl, pH 8.8; 20 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1 % Triton <sup>®</sup> X-100; 1 mg/ml BSA
MasterAmp Selfmix E	1x Enhancer; 1x Taq-Polymerase-Puffer; 2 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0.2 mM dNTP-Mix; 0.1 mg/ml Gelatine
dNTP-Mix	je 25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

### **3.2.1. Präparative Anwendung der PCR**

Zur Gewinnung eines spezifischen DNA-Abschnittes für anschließende Klonierungsarbeiten werden folgende Protokolle angewendet :

#### **a) Herkömmliche PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA als Template**

<u>PCR-Ansatz:</u>	4 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer
	0.32 µl dNTP-Mix
	1.6 µl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
	0.4 µl 10 mg/ml Gelatine
	0.4 µl 100 µM Primer 1
	0.4 µl 100 µM Primer 2
	32 µl H <sub>2</sub> O
	0.48 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl)
	0.4 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
	40 µl Gesamtvolumen

#### Zyklusbedingungen:

vor dem 1. Zyklus	2 min bei 94°C
40 Zyklen à	30 sec bei 94°C 30 sec bei 52°C bzw. 46°C (je nach Primerwahl) 60 sec + 2 sec/Zyklus bei 72 °C
Abschlußzyklen	10 min bei 72°C ∞ bei 8°C

#### **b) MasterAmp-PCR unter Verwendung von cDNA als Template**

<u>PCR-Ansatz:</u>	21.3 µl H <sub>2</sub> O
	25 µl MasterAmp Selfmix E
	0.4 µl Primer 1
	0.4 µl Primer 2
	0.4 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
	2.5 µl cDNA
	50 µl Gesamtvolumen

<u>Zyklusbedingungen:</u>	siehe unter a)
---------------------------	----------------

Im Anschluß an die PCR wird die amplifizierte DNA einer Agarosegelelektrophorese (vgl. B 3.1.5.) unterzogen, das Fragment der entsprechenden Größe herausgeschnitten und mit Hilfe eines Kits zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen aufgereinigt (vgl. B 3.1.6.).

### 3.2.2. Analytische Anwendung der PCR

Außer zur Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten zu präparativen Zwecken eignet sich die PCR auch zur Analyse von Bakterienkolonien nach einer Transformation (vgl. 3.3.4.). Durch die Wahl von Primerkombinationen, die nur mit dem gewünschten Konstrukt ein PCR-Produkt von bestimmter Größe ergeben, ist es möglich, die Bakterienkolonien zu identifizieren, die das gesuchte Konstrukt tragen.

Für diesen sogenannten Kolonie-Check wird folgendes Protokoll angewendet :

<u>PCR-Ansatz:</u>	1.5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer
	0.12 µl dNTP-Mix
	0.6 µl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
	0.15 µl 10 mg/ml Gelatine
	0.15 µl 100 µM Primer 1
	0.15 µl 100 µM Primer 2
	12.18 µl H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
	0.15 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
	15 µl Gesamtvolumen

In diesen Ansatz wird mit einem sterilen Zahnstocher ein wenig von einer Bakterienkolonie überführt. Das in den Bakterien vorliegende Plasmid wird während des ersten Denaturierungsschrittes freigesetzt und dient schließlich als Template für die Polymerasereaktion.

Die Zyklusbedingungen entsprechen weitgehend den unter B 3.2.1. beschriebenen mit dem Unterschied, daß anstelle von 40 Zyklen nur 30 Zyklen durchlaufen werden.

Nach einer elektrophoretischen Auftrennung (vgl. B 3.1.5.) lassen sich anhand der PCR-Produkte die Kolonien mit dem gewünschten Plasmid identifizieren.

### 3.2.3. Gerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR

(nach der Firmenvorschrift von Stratagene „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“)

Neben der reinen Amplifikation von DNA läßt sich die PCR-Technik auch dazu nutzen, gezielt Mutationen - wie Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen - in eine Nukleotidsequenz einzuführen. Das Prinzip einer solchen PCR-gestützten Mutagenese beruht auf der Verwendung von sogenannten *mismatch*-Primern. Diese Primer zeichnen sich dadurch aus, daß sie sich in ihrer Sequenz in den Nukleotiden von der Matrizen-DNA unterscheiden, die zu der gewünschten Mutation führen.

Auch das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit, welches zur Einführung einer *AscI*-Restriktionsschnittstelle in den infektiösen Klon pTEV H/C verwendet wurde, arbeitet nach diesem Prinzip. Der Weg von der Ausgangs- bis zur mutierten Sequenz läßt sich in drei Teilreaktionen gliedern:

Die erste Reaktion umfasst eine PCR, durch die die gewünschte Mutation eingeführt wird. Als Matrizen-DNA dient ein circuläres Plasmid, welches die zu mutierende Sequenz trägt. Die *mismatch*-Primer werden so gewählt, daß sie in ihrer Mitte die

gewünschten Nukleotidaustausche tragen und sich an die gleiche Sequenz der komplementären DNA-Stränge anlagern können. Die Amplifikation erfolgt durch eine spezifische DNA-Polymerase (Pfu-Turbo). Endprodukt dieser PCR ist circulaire, doppelsträngige DNA mit Strangbrüchen zwischen 3'-Ende des jeweiligen Stranges und 5'-Ende des jeweiligen Primers.

Im Anschluß an die PCR wird in einer zweiten Reaktion die nicht-mutierte Matrizen-DNA aus dem Ansatz entfernt. Hierfür macht man sich die Eigenschaft der Restriktionsendonuklease DpnI zunutze, die ausschließlich methylierte oder hemimethylierte DNA zu schneiden vermag. Da nach der PCR lediglich die in Bakterien erzeugte Matrizen-DNA in methylierter Form vorliegt, wird nur sie von diesem Enzym geschnitten, während die nicht-methylierte, mutierte DNA unversehrt bleibt.

Der so behandelte Ansatz wird schließlich in einem dritten Schritt in *E. coli* transformiert, wo mittels des bakterieneigenen Reparatursystems die durch zahlreiche Strangbrüche gekennzeichnete Matrizen-DNA ersetzt wird und die verbleibenden Einzelstrangbrüche beseitigt werden. Aus den Bakterien läßt sich darauf das Plasmid mit der mutierten Sequenz isolieren.

Die PCR bzw. die Restriktionsspaltung mit DpnI werden nach folgendem Protokoll durchgeführt :

<u>PCR-Ansatz:</u>	5 µl 10x Reaktionspuffer
	1 µl Plasmid-DNA (50 ng/µl)
	1 µl Primer 1 (125 ng/µl)
	1 µl Primer 2 (125 ng/µl)
	1 µl dNTP-Mix
	40 µl H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
	1 µl PfuTurbo DNA-Polymerase (2.5 U/µl)
	50 µl Gesamtvolumen

Zyklusbedingungen:

vor dem 1. Zyklus	30 sec bei 95°C
16 Zyklen à	30 sec bei 95°C
	60 sec bei 55°C
	25 min bei 68 °C
Abschlußzyklus	∞ bei 37°C

DpnI-Spaltung:

Direkt im Anschluß an die PCR unmittelbar nach Erreichen der Endtemperatur von 37°C wird dem PCR-Mix 1 µl DpnI (10 U/µl) zugegeben und der Ansatz ca. 2 h bei 37°C inkubiert.

5 µl des Ansatzes werden dann nach herkömmlichem Protokoll in *E. coli* transformiert.

### 3.3. DNA-Klonierung

#### 3.3.1. Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, spezifische Nukleotidsequenzen innerhalb eines DNA-Moleküls zu erkennen und an dieser Stelle die Phosphodiesterbindungen in beiden DNA-Strängen zu spalten. In der Molekularbiologie haben sie daher Verwendung zur Identifizierung von rekombinanten Plasmiden, zum Nachweis einzelner Restriktionsschnittstellen sowie zur Herstellung bestimmter Restriktionsfragmente zur nachfolgenden Klonierung gefunden.

Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird durch Faktoren wie eingesetzte Enzymmenge, Zusammensetzung des Reaktionspuffers und Inkubationstemperatur wesentlich bestimmt. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, werden für eine Restriktionspaltung die vom Hersteller mitgelieferten Puffersysteme verwendet und die empfohlenen Reaktionsbedingungen eingehalten.

Für eine präparative Spaltung werden 5-10 µg Plasmid-DNA eingesetzt, während für analytische Zwecke ca. 0.5 µg ausreichend sind.

#### 3.3.2. Ligationsreaktion

Die Ligation ist eine Methode zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten, die z.B. durch eine Restriktionsspaltung entstanden sind. Voraussetzung hierfür ist, daß die zu ligierenden Fragmente kompatible Enden in Form von komplementären überstehenden oder glatten Enden besitzen. Im allgemeinen dient die Ligationsreaktion zur Klonierung von DNA-Fragmenten (Inserts) in einen Vektor.

Die Verknüpfung von Vektor und Insert erfolgt mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase, welche unter ATP-Hydrolyse die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen 3'OH- und 5'Phosphat-Enden der DNA katalysiert.

In einer herkömmlichen Reaktion werden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit 0.5 U T4-Ligase in einem 10 µl Ansatz unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers ligiert. Die Inkubation erfolgt 3 h bei 22°C oder alternativ über Nacht bei 4°C.

Der Ligationsansatz wird dann zur Transformation in *E. coli* verwendet.

#### 3.3.3. Dephosphorylierung von Vektoren

Die Dephosphorylierung stellt eine Möglichkeit dar, die Religation eines durch Restriktionsspaltung entstandenen, linearisierten Vektors mit kompatiblen Enden zu unterbinden und damit den Anteil der erwünschten Ligationsprodukte zu erhöhen.

Mit Hilfe einer Alkalischen Phosphatase (CIAP) werden die für eine Ligation notwendigen 5'Phosphatgruppen des linearisierten Vektors abgespalten. Der Vektor kann so nur mit einem DNA-Fragment verknüpft werden, welches diese Phosphatgruppen noch besitzt und kann somit nicht mit sich selbst ligiert werden.

Für einen herkömmlichen Dephosphorylierungsansatz werden ca. 10 µg aufgereinigter, linearisierter Vektor mit 1 U CIAP in 1x Ligasepuffer (0.5 M Tris-HCL, pH 8.5; 1 mM EDTA) und einem Reaktionsvolumen von 60 µl 1 h bei 37°C inkubiert.

Der Ansatz wird anschließend mit Hilfe des NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit (vgl. B 3.1.7.) aufgereinigt und die DNA zur Ligation (vgl. B 3.3.2.) verwendet.

### 3.3.4. Transformation von DNA in *E. coli*

(modifiziert nach Hanahan, 1985)

Die Transformation von DNA in *E. coli* erfolgt nach der Calciumchlorid/Rubidiumchlorid-Methode.

#### a) Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen

##### Lösungen:

PZ-Medium	2 % Bacto-Trypton; 0.5 % Hefeextrakt; 0.05 % NaCl; 20 mM MgSO <sub>4</sub> ; 10 mM KCl
TFB 1	30 mM KOAc; 50 mM MnCl <sub>2</sub> ; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15 % Glycerin → pH 5.8
TFB 2	10 mM NaMOPS; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM RbCl <sub>2</sub> ; 15 % Glycerin → pH 7.0

Bakterien des entsprechenden Stammes werden auf 2xYT-Festmedium ohne Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

500 ml PZ-Medium werden mit 3-5 Einzelkolonien angeimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0.5-0.6 inkubiert. Die Kultur wird 20 min bei 1800 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 15 ml eiskaltem TFB 1 vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wird nochmals 20 min bei 1800 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 2 ml TFB 2 durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden zu 100 µl-Portionen aliquotiert und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgen so weit als möglich auf Eis.

#### b) Transformation hitzekompetenter *E. coli*-Zellen

SOC-Medium	2xYT flüssig 1 % Glukose; 20 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM MgSO <sub>4</sub>
------------	--

Für die Transformation in hitzekompetente *E. coli*-Zellen werden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz (vgl. B 3.3.2.) bzw. 0.2 µg Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 sec einem Hitzeschock von 42°C unterzogen. Nach einer weiteren Inkubation von 2 min auf Eis werden 900 µl SOC-Medium zugeben und der Ansatz 45-60 min bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Bakterien werden durch kurzes Zentrifugieren bei 6500 rpm pelletiert, der Überstand bis auf 100-200 µl verworfen und die im Restmedium resuspendierten Zellen auf 2xYT-Festmedium mit entsprechenden Zusätzen ausgestrichen. Im Falle einer Retransformation von Plasmid-DNA werden lediglich 50-80 µl des Gesamtansatzes ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien werden anschließend in einer Koloniecheck-PCR (vgl. B 3.2.2.) auf das gewünschte Plasmid hin getestet.

### 3.3.5. Transformation von DNA in *Agrobacterium tumefaciens*

(modifiziert nach Firmenvorschrift BIO-RAD „High efficiency electro-transformation of *E. coli*“)

Im Gegensatz zu *E. coli* erfolgte die Transformation von Agrobakterien mit Hilfe der Elektroporation. Dieses Verfahren ist eines der effektivsten Methoden zur Transformation von Bakterien. Bei der Elektroporation werden kompetente Empfängerzellen

kurzen, elektrischen Pulsen ausgesetzt, wodurch vermutlich vorübergehend Poren in der Zellmembran geöffnet werden, durch die die DNA-Moleküle ins Zellinnere gelangen können. Dieses Verfahren eignet sich nicht nur zur Transformation von Bakterien, sondern lässt sich mit hoher Effizienz auch bei Pflanzen, Hefen und anderen Pilzen in Form von Protoplasten anwenden.

#### a) Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter Agrobakterien-Zellen wird 1 l LB<sub>mod</sub>-Medium mit 10 ml einer Agrobakterien-Übernachtskultur angeimpft und unter kräftigem Schütteln bei 28°C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0.4-0.6 inkubiert. Nach Erreichen der notwendigen OD<sub>550</sub> wird der Kolben 15 min auf Eis gekühlt, die Bakteriensuspension auf sterile Zentrifugenbecher verteilt und 15 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Zentrifugation schließt sich zunächst ein Waschschriff mit 1 l sterilem, eiskaltem 1 mM Hepes-Puffer, pH 7.0 an. Darauf folgt ein weiterer Waschschriff mit 0.5 l dieses Puffers. Abschließend werden die Zellen mit 20 ml kaltem 10 %igem Glycerin gewaschen, das Pellet in 2-3 ml 10 %igem Glycerin aufgenommen und die Suspension zu 40 µl-Portionen in Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

#### b) Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* durch Elektroporation

SOB-Medium      20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0.5 g/l NaCl; 10 ml/l 250 mM KCl  
pH 7.0 mit NaOH  
nach Autoklavieren + 5 ml/l steriles 2 M MgCl<sub>2</sub>

Zur Elektroporation werden die kompetenten Zellen mit Handwärme schnell aufgetaut und ebenso wie die Elektroporations-Küvetten auf Eis gestellt. Zu 40 µl Bakteriensuspension werden 0.2 µg Plasmidlösung gegeben und leicht gemischt. Das Gemisch wird nun zügig in eine vorgekühlte Küvette transferiert und sofort mit Hilfe des Elektroporators elektroporiert. Dabei gilt folgende Geräteeinstellung:

Resistance	200 Ω
Capacitance	25 µF
Set Volts	2.5 kV

Nach der Elektroporation wird in die Küvette 1 ml SOB-Medium gegeben. Der Ansatz wird mit einer sterilen Pasteurpipette in ein Reaktionsgefäß überführt und zur Ausprägung der auf dem Plasmid enthaltenen Resistenz 4 h bei 28°C inkubiert. Anschließend werden Aliquots von 50 µl auf LB<sub>mod</sub>-Festmedium, welches die zur Selektion notwendigen Antibiotika enthält, ausplattiert. Die Platten werden mit der Agarseite nach oben 48 h bei 28°C inkubiert.

### 3.3.6. Präparation von Plasmid-DNA

#### a) Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

(modifiziert nach Birnboim and Doly, 1979)

##### Lösungen:

Lösung I	50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA
Lösung II	0.2 M NaOH; 1 % SDS
Lösung III	3 M Kaliumacetat, pH 4.8

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab dient die Plasmid-Minipräparation. Sie findet z.B. Anwendung im Anschluß an eine Transformation zur Identifizierung der Bakterienkolonien, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben.

Für eine Minipräparation werden 3 ml 2xYT-Flüssigmedium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Von dieser Übernachtskultur werden 1.5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 8500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 150 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Lösung II werden die Bakterienzellen aufgeschlossen und sowohl die genomische als auch die Plasmid-DNA in denaturiertem Zustand freigesetzt. Die Zugabe von 225 µl Lösung II resultiert schließlich in einer Neutralisierung des Ansatzes, welche eine rasche Renaturierung der Plasmid-DNA und die Bildung eines unlöslichen Präzipitats aus genomischer DNA, Zellwandbestandteilen und Proteinen zur Folge hat. Das Präzipitat wird durch 20 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C pelletiert und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA durch eine Alkoholpräzipitation (vgl. B 3.1.3.) gefällt. Die DNA wird nach der Fällung in 30-40 µl TE-Puffer aufgenommen, ein Aliquot einer Restriktionsanalyse (vgl. B 3.3.1.) unterzogen und das daraus resultierende Restriktionsmuster durch Agarosegelelektrophorese (vgl. B 3.1.5.) analysiert.

#### **b) Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab**

(nach der Firmenvorschrift von Macherey-Nagel „Nucleobond AX“)

Die Plasmid-Midipräparation folgt dem gleichen Prinzip der alkalischen Lyse wie die Minipräparation. Die Unterschiede bestehen darin, daß die Midipräparation in weit größerem Maßstab durchgeführt werden kann und die Plasmid-DNA nach der Isolierung durch Ionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt wird, so daß sie sich für Anwendungen eignet, die einen hohen Reinheitsgrad der DNA erfordern.

Für die Präparation wird das Nucleobond AX 100-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgt nach Firmenprotokoll unter Verwendung von 50 ml Übernachtskultur für *high copy*-Plasmide bzw. 100 ml Übernachtskultur für *low copy*-Plasmide. Die durch eine anschließende Isopropanolfällung (vgl. B 3.1.3.) aufkonzentrierte DNA wird mit TE-Puffer auf eine Konzentration von ~1 µg/µl gebracht.

### **3.4. Expression viraler Hüllproteine in *Escherichia coli***

#### **3.4.1. Expression von viralen Hüllproteinen in BL 21 (DE3)**

Für die Expression von viralem Hüllprotein in *E. coli* werden die auf dem Expressionsvektor pSBET b basierenden Konstrukte in hitzekompetente Zellen des Expressionsstammes BL 21 (DE3) transformiert (vgl. B 3.3.4.).

100 ml 2x YT werden mit 30 µg/ml Kanamycin und 0.05 % Glucose versetzt und mit einer Einzelkolonie des transformierten Expressionsstammes angeimpft. Die Kultur wird bei 37°C und 150 rpm inkubiert und bei Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0.6-0.8 mit 1 mM IPTG induziert. Die weitere Inkubation erfolgt bei 28°C und 150 rpm.

#### **3.4.2. Probenvorbereitung für den Nachweis der exprimierten Hüllproteine in der Western-Analyse**

##### Lösungen:

1x Laemmli-Puffer

6.25 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2 % SDS; 10 % Glycerin;  
5 % β-Mercaptoethanol

Für die Analyse der exprimierten Hüllproteine im SDS-Polyacrylamidgel (vgl. B 3.7.6. a)) mit anschließendem Western Blot (vgl. B 3.7.6. b)) werden 2 h nach Induktion 2 ml der Expressionskultur 2 min bei 8500 rpm abzentrifugiert, der Überstand vollständig verworfen und das Pellet in 200 µl 1x Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Probe wird 10 min bei 100°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.4.3. Aufreinigung von virusähnlichen Partikeln (VLPs)

#### Lösungen:

TEN-Puffer                      10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 0.14 M NaCl

Zur Untersuchung der Bildung von virusähnlichen Partikeln durch in *E. coli* exprimiertes Hüllprotein werden 2-3 h nach Induktion 50 ml der Expressionskultur für 15 min bei 4500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml TEN-Puffer resuspendiert und die Suspension erneut 15 min bei 4500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml TEN-Puffer mit 0.1 mg/ml Lysozym gelöst und 30 min auf Eis inkubiert. Die durch die zellwandauflösende Wirkung des Lysozyms freigesetzten VLPs können schließlich mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie (vgl. B 3.7.5.) detektiert werden.

## 3.5. Übertragung von Viren auf Pflanzen

### 3.5.1. Erhaltung und Vermehrung von Viren

#### Lösungen:

Sörensen-Phosphatpuffer                      500 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 500 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7.2

Zur Erhaltung und Vermehrung der verschiedenen Virus-Isolate (PVX, PVY, TEV und TRV) wird *Nicotiana tabacum* var. Samsun als Wirtspflanze verwendet. Die Übertragung der Viren erfolgt durch mechanische Inokulation gesunder Pflanzen mit virushaltigem Pflanzensaft. Dazu wird virusinfiziertes Blattmaterial in Sörensenpuffer gemörstert und mit Hilfe eines Glasspatels auf die mit Carborund bestäubten Blätter der Wirtspflanze abgerieben.

Zur Aufrechterhaltung der Viruspopulation werden die Isolate im Abstand von 4-6 Wochen auf frische Pflanzen übertragen.

### 3.5.2. Infektion von Pflanzen mit viralen cDNA-Klonen

#### a) Verwendung von viralen cDNA-Konstrukten unter der Kontrolle des CaMV 35S RNA-Promotors

Mit Hilfe eines vorgeschalteten 35S RNA-Promotors aus CaMV ist es möglich, eine virale cDNA-Sequenz direkt *in vivo* zu transkribieren. Das Konstrukt muß dazu lediglich durch mechanische Inokulation in die Pflanzenzelle eingebracht werden. Dort wird der 35S-Promotor von pflanzeigenen RNA-Polymerasen erkannt und die dahinterliegende virale cDNA transkribiert und translatiert. Aus den entstandenen viralen Proteinen und der Virus-RNA werden Viruspartikel zusammengebaut, und es kommt - wie bei einer normalen Infektion - zu einer Ausbreitung des Virus in der Wirtspflanze.

Für die Inokulation werden ~5 µg Plasmid-DNA mit 30-50 µl Sörensen-Phosphatpuffer versetzt und auf ein mit Carborund bestäubtes Blatt einer geeigneten Wirtspflanze aufgerieben. Für die verschiedenen Konstrukte werden die in Tab. 2 aufgeführten



Pflanzen verwendet. Die Pflanzen werden in einer Klimakammer bei 19°C und einem Tag/Nacht-Zyklus von 16 h hell und 8 h dunkel gehalten.

### **b) Verwendung von viralen cDNA-Konstrukten unter der Kontrolle eines SP6- oder T7-RNA-Promotors**

#### Lösungen für *in-vitro* Transkription:

5x Transkriptionspuffer	400 mM HEPES-KOH, pH 7.5; 160 mM MgCl <sub>2</sub> für SP6 bzw. 120 mM MgCl <sub>2</sub> für T7; 10 mM Spermidin; 200 mM DTT
rNTP-Gemisch	je 25 mM ATP, CTP und UTP

Im Falle von viralen cDNA-Konstrukten mit vorgeschaltetem SP6- oder T7-RNA-Promotor wird die virale cDNA-Sequenz zunächst einer *in-vitro* Transkription unterzogen, und erst die daraus resultierenden RNA-Transkripte werden durch mechanische Inokulation in eine Wirtspflanze eingebracht. Ausgehend von diesen Transkripten entstehen in der Pflanzenzelle nun ebenfalls virale Proteine und Virus-RNA, welche die Grundlage für die Etablierung einer Virusinfektion in der inokulierten Pflanze bilden.

Die Herstellung der *in-vitro* Transkripte erfolgt unter Verwendung des „RiboMAX™ Large Scale RNA Production System“ von Promega. Hierzu wird das über eine Midipräparation gewonnene cDNA-Konstrukt zunächst durch eine geeignete Restriktionsendonuklease linearisiert (vgl. B 3.3.1.). Um die Entstehung unspezifischer Transkripte zu vermeiden, sollte ein Enzym gewählt werden, das 3' von der zu transkribierenden Sequenz glatte oder 5'-überstehende Enden produziert. Die Linearisierung der auf CymMV-basierenden Konstrukte erfolgt durch Sma I, während die auf TEV-basierenden Konstrukte mit Bgl II gespalten werden. Die linearisierte DNA wird mit Hilfe des NucleoSpin-Kits aufgereinigt (vgl. B 3.1.7.).

Das gereinigte Konstrukt kann nun für die Transkriptionsreaktion eingesetzt werden. Je nachdem welcher Promotor der viralen Sequenz vorgeschaltet ist, wird eine SP6- oder eine T7-RNA-Polymerase zur Transkription verwendet.

<u>Transkriptionsansatz:</u>	2 µl 5x Transkriptionspuffer
	1.5 µl rNTP-Gemisch
	0.24 µl 25 mM GTP
	0.6 µl 40 mM Cap-Struktur
	1 µl linearisierte DNA (1 µg/µl)
	3.66 µl RNase-freies H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
	1 µl Enzym-Mix
	10 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wird bei Raumtemperatur zusammenpipettiert und 2-4 h bei 37°C inkubiert.

Der gesamte Ansatz wird anschließend mit Sörensen-Phosphatpuffer auf 30-50 µl verdünnt und auf ein mit Carborund bestäubtes Blatt einer geeigneten Wirtspflanze (vgl. Tab. 2) abgerieben. Die Pflanzen werden in einer Klimakammer bei 19°C und einem Tag/Nacht-Zyklus von 16 h hell und 8 h dunkel gehalten.

Tab. 2: Für virale cDNA-Klone verwendete Wirtspflanzen und für Inokulation benötigte RNA- bzw. DNA-Mengen

virale cDNA-Klone basierend auf	Wirtspflanze	Inokulation als	inokulierte Menge
CIYVV	<i>Chenopodium quinoa</i>	35S-Konstrukt	5 µg DNA
CymMV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	T7-Transkript	10 µl Transkript
PVX	<i>Nicotiana benthamiana</i> <i>Datura stramonium</i>	35S-Konstrukte	5 µg DNA
TEV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	SP6-Transkript	10 µl Transkript

### 3.6. Extraktion von Gesamt-Protein aus virusinfizierten Pflanzen

(nach Tacke et al., 1996)

#### Lösungen:

1x Laemmli-puffer	0.125 M Tris-HCl, pH 6.8; 2 % SDS; 10 % v/v Glycerin 5 % β-Mercaptoethanol
Probenpuffer	6 M Harnstoff, 2 % Essigsäure

Zur Gewinnung von Gesamt-Protein aus virusinfizierten Pflanzen werden ca. 300 mg Blattmaterial unter Stickstoff gemörsert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu den Proben werden 800 µl 1x Laemmli-puffer gegeben, homogenisiert und 5 min bei 100°C inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln werden die Proben 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zur Fällung mit 2 Vol. 100 %igem Aceton versetzt. Die Fällung erfolgt 1 h bis über Nacht bei -20°C. Die ausgefallenen Proteine werden 10 min bei 13000 rpm pelletiert, mit 70 %igem Aceton gewaschen, leicht getrocknet und in 200 µl Proben-puffer aufgenommen. Um eine vollständige Resuspendierung der Proteine zu gewährleisten, werden die Proben mehrere Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gelöste Bestandteile werden durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, der proteinhaltige Überstand wird abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Das extrahierte Gesamt-Protein kann nun für eine Analyse im SDS-Polyacrylamidgel (vgl. B 3.7.6. a)) mit anschließendem Western Blot (vgl. B 3.7.6. b)) eingesetzt werden.

### 3.7. Allgemeine serologische Methoden

#### 3.7.1. Gewinnung von Immunglobulinen

(modifiziert nach Clark and Adams, 1977)

#### Lösungen:

1x PBS-Puffer	8 g/l NaCl; 0.2 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1.44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ; 0.2 g/l $\text{NaN}_3$ pH 7.4
---------------	---

1 ml Rohserum wird mit Aqua<sub>dest.</sub> auf 10 ml aufgefüllt, zur Fällung der Proteine tropfenweise mit 1 Vol. gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (80%) unter Rühren versetzt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgefällten Proteine werden durch 15 minütige

Zentrifugation bei 6000 rpm pelletiert und das Pellet in 2 ml 0.5x PBS aufgenommen. Die Lösung wird über Nacht bei 4°C gegen 0.5x PBS unter mehrmaligem Wechseln des Puffers dialysiert.

Anschließend folgt eine Fraktionierung der Immunglobuline mittels Ionenaustausch-Chromatographie. Dazu wird die dialysierte Probe auf eine mit 0.5x PBS äquilibrierte DEAE (Diethylaminoethyl) -52 Cellulose-Säule aufgebracht und die Immunglobuline mit 0.5x PBS eluiert. Das Eluat wird in 500 µl Fraktionen aufgefangen. Die optische Dichte der einzelnen Fraktionen bei 280 nm wird ermittelt und die Immunglobulin-Konzentration auf 1 mg/ml eingestellt, wobei eine Konzentration von 1 mg/ml einer OD<sub>280</sub> von 1.4 entspricht. Bis zum weiteren Gebrauch werden die aufgereinigten Immunglobuline bei 4°C gelagert.

### 3.7.2. Herstellung von Antikörper-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugaten

(modifiziert nach Clark and Adams, 1977)

Zur Herstellung des Antikörper-AP-Konjugats werden 70 µl Alkalische Phosphatase (CIAP for enzyme immunoassay, Boehringer Mannheim) für 1 h bei Raumtemperatur gegen 0.125 % Glutaraldehyd in 0.5x PBS dialysiert. Nach Zugabe von 1 ml Immun-globulin-Lösung folgt eine Fortsetzung der Dialyse für 1 h im gleichen Puffer. Eine weitere Dialyse über Nacht bei 4°C gegen 1x PBS gewährleistet eine Entfernung von überschüssigem Glutaraldehyd. Das erhaltene Konjugat wird schließlich mit 5 mg BSA und 1/100 Vol. einer 0.25 %igen NaN<sub>3</sub>-Lösung versetzt und bei 4°C gelagert.

### 3.7.3. *Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)*

(modifiziert nach Clark and Adams, 1977)

#### Lösungen:

1x PBS-Puffer	vgl. B 3.7.1.
Beschichtungspuffer	1.59 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 2.93 g/l NaHCO <sub>3</sub> ; 0.2 g/l NaN <sub>3</sub> pH 9.6
Waschpuffer	0.05 % Tween-20 in 1x PBS-Puffer
Probenpuffer	0.025 % Tween-20; 2 % Polyvinylpyrrolidon-11000 in 1x PBS-Puffer
Substratpuffer	97 ml/l Diethanolamin; 0.1 g/l NaN <sub>3</sub> pH 9.8

Der ELISA ist eine Methode zum spezifischen Nachweis von Proteinen unter Verwendung von Antikörpern, mit deren Hilfe sich selbst geringste Mengen des Antigens quantitativ bestimmen lassen. In dieser Arbeit dient diese Methode zum Nachweis von Viruspartikeln in einer infizierten Pflanze.

In einem sogenannten DAS-ELISA wird an eine polymere Matrix, hier eine ELISA-Platte aus Polyvinylchlorid, zunächst ein virusspezifischer Antikörper gebunden, welcher mit den im nächsten Schritt zugegebenen Viruspartikeln einen Komplex bildet. Darauf wird ein Antikörper/Alkalische Phosphatase-Konjugat zugefügt, welches ebenfalls in der Lage ist, das durch den ersten Antikörper gebundene Viruspartikel zu erkennen. Durch die Aktivität der an den zweiten Antikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase, welche ein zugegebenes farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umsetzt, lässt sich der Antikörper/Antigen-Komplex schließlich nachweisen.

Für einen solchen Test wird die ELISA-Platte zunächst mit einem virusspezifischen Immunglobulin (IgG) beschichtet. Hierzu werden 100 µl des entsprechend in Beschich-

tungspuffer verdünnten IgGs (vgl. B 2.9., Tab. 1) pro Vertiefung verwendet. Nach einer 2-4 stündigen Inkubation bei 32°C wird die Platte 3 x 3 min mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100 µl des mit Probenpuffer im Verhältnis 1:25 verdünnten Pflanzensaftes beschickt. Der Ansatz wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden nach einem erneuten Waschschrift von 3 x 3 min mit Waschpuffer je 100 µl des in Probenpuffer entsprechend verdünnten Antikörper-AP-Konjugat aufgetragen und nochmals für 2-4 h bei 32°C inkubiert. Nach einem dritten Waschschrift 3 x 3 min mit Waschpuffer werden schließlich je 200 µl 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer zugeben und 40-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gebundenen Viruspartikel lassen sich darauf anhand der photometrischen Messung der Farbreaktion bei 405 nm quantitativ nachweisen.

### 3.7.4. Herstellung viraler cDNAs

Um die Nukleinsäuresequenz eines RNA-Virus für molekularbiologische Zwecke nutzen zu können, muß die aus den Viruspartikeln gewonnene RNA durch reverse Transkription zunächst in eine cDNA umgeschrieben werden. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Methoden zur Gewinnung von cDNA aus viraler RNA angewendet, die im folgenden beschrieben werden.

#### Lösungen für die cDNA-Synthese:

5x First Strand Buffer	250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP-Mix	je 25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

#### **a) Extraktion von Gesamt-RNA aus virusinfizierten Pflanzen mit anschließender Synthese der viralen cDNA**

Für die Extraktion der Gesamt-RNA aus virusinfizierten Pflanzen wird das „RNeasy Plant Mini-Kit“ von Qiagen genutzt. Die Aufarbeitung erfolgt mit 50-100 mg auf Stickstoff gemörsertem Blattmaterial laut Protokoll. Die so gewonnene Gesamt-RNA kann dann direkt für die reverse Transkription unter Verwendung eines für die jeweilige Virussequenz spezifischen antisense-Primers eingesetzt werden.

Die cDNA-Synthese wird mit Hilfe des Superscript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase-Systems von Gibco BRL nach folgendem Ansatz 1 h bei 37-42°C durchgeführt.

#### Reaktionsansatz:

5 µl	5x First Strand Buffer
2 µl	0.1 M DTT
1.25 µl	dNTP-Mix
1 µl	100 µM antisense-Primer
0.5 µl	RNAse-freies H <sub>2</sub> O
0.5 µl	Superscript (200 U/µl)
10 µl	Gesamt-RNA-Extrakt
20 µl	Gesamtvolumen

Die erhaltene cDNA kann schließlich direkt für eine MasterAmp-PCR (vgl. B 3.2.1. b)) eingesetzt werden.

**b) Immunocapture-Reverse Transkriptase-Reaktion**

(modifiziert nach Koenig et al., 1995)

Lösungen:

20x SSC	3 M NaCl; 300 mM Natriumcitrat pH 7.0
1x PBS-Puffer	vgl. B 3.7.1.
Beschichtungspuffer	vgl. B 3.7.3.
Waschpuffer	vgl. B 3.7.3.
Probenpuffer	vgl. B 3.7.3.

Eine weitere Methode zur Gewinnung der viralen RNA ist die Immunocapture, bei der die Viruspartikel zunächst über einen virusspezifischen Antikörper an eine polymere Matrix gebunden werden und die virale RNA anschließend durch eine Hitzedenaturierung der Virushülle freigesetzt wird. Die freigesetzte Virus-RNA kann darauf einer reversen Transkription unterzogen werden.

200 µl des in Beschichtungspuffer verdünnten virusspezifischen Immunglobulins werden in ein 0.5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 2-4 h bei 32°C inkubiert. Die Verdünnung des Immunglobulins entspricht dabei der doppelten Konzentration gegenüber der für den ELISA angegebenen (vgl. B 2.9., Tab. 1). Im Anschluß an die Inkubation folgt ein Waschschrift von 3 x 3 min mit Waschpuffer. Darauf werden 150 µl des mit Probenpuffer 1:25 verdünnten Saftes einer virusinfizierten Pflanze in das Antikörper-beschichtete Reaktionsgefäß gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach mehreren Waschschriften (2 x 3 min mit Waschpuffer, 1 x 3 min mit 1x PBS, 1 x 3 min mit Aqua<sub>dest.</sub>) werden die angereicherten Viruspartikel aufgeschlossen, und die freigesetzte RNA kann als Template für eine cDNA-Synthese verwendet werden.

Dazu werden 64.6 µl H<sub>2</sub>O, 0.7 µl antisense-Primer und 1.7 µl 20x SSC in das partikel-beschichtete Reaktionsgefäß pipettiert und die Viruspartikel 3 min bei 80°C im Wasserbad denaturiert. Der Ansatz wird langsam auf 20°C abgekühlt, so daß der zugegebene Primer an die komplementäre Sequenz auf der viralen RNA anlagern kann. Für die cDNA-Synthese werden 20 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl dNTP-Mix, 10 µl 0.1 M DTT und 1 µl Superscript zugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die entstandene cDNA kann nach einem Denaturierungsschritt von 10 min bei 100°C für eine MasterAmp-PCR (vgl. B 3.2.1. b)) eingesetzt werden.

**3.7.5. Immunelektronenmikroskopische Detektion von Viruspartikeln:*****Immunsorbent electron microscopy (ISEM) und Dekorationstest***

(nach Milne and Lesemann, 1984)

Mit Hilfe eines Elektronenmikroskops ist es möglich, Viruspartikel sichtbar zu machen und sie anhand ihrer Morphologie zu charakterisieren. Eine besondere Form der Elektronenmikroskopie ist die sogenannte *immunsorbent electron microscopy* (ISEM). Diese Methode verwendet EM-Netze, die mit einem für das zu untersuchende Virus spezifischen Antikörper beschichtet sind. Viruspartikel werden durch diesen Antikörper abgefangen und angereichert, wodurch die Detektion und Charakterisierung wesentlich erleichtert wird.

Für die eindeutige Identifizierung eines Virus bietet sich ein anschließender Dekorationstest an. Das mit Viruspartikeln bestückte EM-Netz wird hierbei mit einem für dieses Virus spezifischen Antikörper inkubiert. Die Antikörper binden an die Viruspartikel und umgeben sie mit einer im EM gut sichtbaren Hülle.

Lösungen:

0.1 M Natrium-Phosphatpuffer    500 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 500 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
pH 7.0

Mit Pioloform befilmte und mit Kohle bedampfte Kupfer-Netze werden mit der bedampften Seite nach unten auf Tropfen aus verdünntem virusspezifischem Immunglobulin (1:200 in 0.1 M Na-Phosphatpuffer) gelegt und 5 min inkubiert. Überschüssige Antikörper werden durch Spülen der beschichteten Netze mit 0.1 M Na-Phosphatpuffer entfernt und die Netze für 15-30 min auf Tropfen aus mit Phosphatpuffer verdünntem Pflanzensaft überführt. Die Netze werden erneut mit 0.1 M Na-Phosphatpuffer sorgfältig gewaschen und zur Dekoration der gebundenen Viruspartikel auf Tropfen aus 1:10 verdünntem Immunglobulin 15-30 min inkubiert. Anschließend wird überschüssiges IgG durch Spülen mit Aqua<sub>dest.</sub> beseitigt und die Netze mit 1 %iger Uranylacetat-Lösung kontrastiert. Die Präparate können nun im Elektronenmikroskop (EM 10 C von Zeiss) untersucht werden.

Die Anzahl der abgefangenen Viruspartikel wird nach folgenden Kriterien bei einer Vergrößerung von 36 000x bewertet:

- +++ : 100 - 1000 Partikel pro Beobachtungsfeld
- ++ : 10 - 100 Partikel pro Beobachtungsfeld
- + : 1 - 10 Partikel pro Beobachtungsfeld
- r : 1 Partikel pro 10 Beobachtungsfelder
- rr : 1 Partikel pro 50 Beobachtungsfelder

**3.7.6. Nachweis viraler Hüllproteine durch Western-Analyse**

(modifiziert nach Laemmli, 1970)

Die Western-Analyse stellt ein Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen dar, mit dessen Hilfe sich selbst kleinste Mengen eines spezifischen Proteins detektieren lassen. Hierzu wird ein Proteingemisch zunächst in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, das Bandenmuster auf eine Trägermembran aus Nitrocellulose oder Nylon übertragen und das gesuchte Protein mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit dient diese Methode zum Nachweis der Expression viraler Hüllproteine in Bakterien und Pflanzen.

**a) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

(modifiziert nach SE 250 - Mighty Small II-Firmenvorschrift von Hoefer)

Lösungen:

SG-Acrylamid-Lösung (für Sammelgel)	30 % Acrylamid; 0.8 % N,N-Methylenbisacrylamid
TG-Acrylamid-Lösung (für Trenngel)	30 % Acrylamid; 0.8 % N,N-Methylenbisacrylamid; 15 % Glycerin
6x Sammelgel-Puffer	0.75 M Tris-HCl, pH 6.8
6x Trenngel-Puffer	2.25 M Tris-HCl, pH 8.8
SDS-PAGE-Laufpuffer	0.025 M Tris-HCl, pH 8.3; 0.192 M Glycin; 0.1 % SDS
5x Probenpuffer	0.625 M Tris-HCL, pH 6.8; 10 % SDS; 0.005 % Brom-phenolblau

Zusammensetzung der Gele:

Die Angaben für Sammel- und Trenngel beziehen sich auf Mengen ausreichend für zwei Gele mit einer Dicke von 1.5 mm.

Sammelgel, 14 %	10.5 ml TG-Acrylamid-Lösung
	3.75 ml 6x Trenngel-Puffer
	8 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
	187.5 µl 10 % SDS
	18.75 µl TEMED
	187.5 µl 10 % APS
Trenngel, 4 %	1.5 ml SG-Acrylamid-Lösung
	1.88 ml 6x Sammelgel-Puffer
	7.88 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
	93.75 µl 10 % SDS
	9.375 µl TEMED
	93.75 µl 10 % APS

Die Auftrennung der nach B 3.4.2. und B 3.6. gewonnenen Proteingemische erfolgt durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung der Elektrophorese-Apparatur SE 250 - Mighty Small II von Hoefer. Unter denaturierenden Bedingungen werden die Proteine im oberen Sammelgel-Bereich des Geles zunächst auf eine scharfe Bande konzentriert und im unteren Trenngel-Bereich schließlich proportional zu dem Logarithmus ihrer molaren Masse aufgetrennt.

Zusammenbau der Kammer und Vorbereitung der Gele werden nach Firmenprotokoll durchgeführt.

Ein Aliquot des nach B 3.4.2. bzw. B 3.6. aufgearbeiteten Proteinextrakts wird mit einer entsprechenden Menge 5x Laemmli-Probenpuffer versetzt, 2 min bei 100°C denaturiert und auf Eis gestellt. Die vorbereiteten Proben werden zusammen mit 10 µl der Prestained Protein Ladder von Gibco in die Tröge des vorbereiteten Gels geladen. Der Gellauf im Sammelgel erfolgt bei 60 V, die Auftrennung im Trenngel ca. 90 min bei 120 V. Nach ausreichendem Lauf kann die Elektrophorese gestoppt und das Gel für den Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Trägermembran vorbereitet werden.

**b) Transfer der aufgetrennten Proteine**

(modifiziert nach Khyse-Andersen, 1984 und Bjerrum and Schafer-Nielsen, 1986)

Lösungen:

Transferpuffer	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 1.3 mM SDS; 20 % Methanol → natürlicher pH-Wert von 9.0-9.4
----------------	--

Für den Transfer der Proteinbanden von der PAA-Gelmatrix auf eine Trägermembran wird eine spezielle Blotting-Apparatur - „Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell“ von Biorad – eingesetzt, welche nach der semi-dry-blotting-Methode nach Khyse-Andersen (1984) und Bjerrum and Schafer-Nielsen (1986) arbeitet.

Im Anschluß an die SDS-PAGE wird das Sammelgel vorsichtig entfernt und das verbleibende Trenngel einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die einzelnen Komponenten des Blotes werden mit Transferpuffer getränkt und in folgender Anordnung luftblasenfrei auf die als Anode dienende, platinbeschichtete Titanium-Platte der Blotting-Apparatur geschichtet: 1 Lage Filterkarton (2 mm) – Trägermembran aus Nitrocellulose –

Trenngel – 1 Lage Filterkarton (2 mm). Den Abschluß des Aufbaus bildet die als Kathode fungierende Stahl-Platte der Blotting-Apparatur. Der Transfer findet 45 min bei 20 V statt. Dem Elektro-Blotting schließt sich die Detektion des gesuchten Proteins mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers an.

### c) Markierung und Detektion spezifischer Proteine

#### Lösungen:

TBS	10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.85 % NaCl
Blocking-Puffer	2 % BSA in TBS
Inkubationspuffer	1 % BSA; 0.05 % NaN <sub>3</sub> ; 0.3 % Triton X-100; 0.05 % Tween-20 in TBS
Waschpuffer	0.85 % NaCl
Substratpuffer	0.1 M Tris-HCl, pH 9.5; 0.1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub>
Stopppuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 5 mM EDTA

Die Detektion beruht auf der Verwendung von zwei Antikörpern. Während der erste Antikörper spezifisch an das gesuchte Protein bindet, ist der zweite Antikörper gegen den ersten gerichtet. Der zweite Antikörper ist darüberhinaus mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt, so daß sich der Antigen/Antikörper-Komplex leicht in einer durch dieses Enzym katalysierten Färbereaktion nachweisen läßt.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wird die Trägermembran nach dem Blotting zunächst 2 h bis über Nacht in Blocking-Puffer belassen und anschließend für 90 min mit dem 1:1000 in Inkubationspuffer verdünnten, proteinspezifischen ersten Antikörper inkubiert. Überschüssiger Antikörper wird durch einen Waschschrift (3 x 3 min mit Waschpuffer) entfernt und die Membran für 90 min in den zweiten Antikörper enthaltenden Inkubationspuffer überführt. Der mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelte zweite Antikörper stammt aus Ziege und ist gegen den aus Kaninchen gewonnenen ersten Antikörper gerichtet. Wie dieser wird der Goat-Anti-Rabbit-AP-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

An einen erneuten Waschschrift schließt sich die Detektion an. Dazu wird die Membran für einige Minuten in Substratpuffer äquilibriert. Durch Zugabe von 0.33 mg/ml NBT (Nitroblau-Tetrazolium) und 0.08 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) wird die Färbereaktion induziert. Das zunächst farblose, chromogene Substrat BCIP geht durch die Aktivität der an den zweiten Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase in ein unlösliches, tiefblaues Produkt über, das sich im Bereich des markierten Proteins auf der Membran niederschlägt. Die Färbereaktion wird zusätzlich durch das purpurfarbene Diformazan verstärkt, welches durch Reaktion des NBT mit den bei der BCIP-Umsetzung freigesetzten H<sup>+</sup>-Ionen entsteht.

Nach ausreichender Inkubation im Dunkeln wird die Reaktion mit Stopppuffer beendet und die Membran auf Filterpapier getrocknet.

### 3.7.7. Affinitätsreinigung von spezifisch gebundenen Antikörpern

(modifiziert nach Rybicki, 1986)

Diese Methode ermöglicht die Rückgewinnung funktionsfähiger Antikörper, die spezifisch an ein durch Western-Blotting immobilisiertes Protein gebunden haben. In der vorliegenden Arbeit werden mit Hilfe dieser Technik TRV ON-Immunglobuline isoliert, die spezifisch mit in *E. coli* exprimierten, veränderten TRV ON-Hüllproteinen assoziiert sind.



**a) Gewinnung der spezifisch gebundenen TRV ON-Antikörper**

Nach B 3.4. in Bakterien exprimiertes und entsprechend vorbereitetes TRV ON-Hüllprotein wird in einer SDS-PAGE (vgl. B 3.7.6. a)) aufgetrennt, wobei die gesamte Breite des Geles für den Probenauftrag genutzt wird. Das Gel wird wie unter B 3.7.6. b) beschrieben geblottet und die Trägermembran über Nacht in Blockingpuffer inkubiert. Von der abgeblockten Membran werden rechts und links ca. 0.5 cm breite Streifen abgeschnitten und für eine Detektion der Hüllproteinbande verwendet (vgl. B 3.7.6. c)). Mit Hilfe der entwickelten Streifen wird der Bereich auf der in Blockingpuffer belassenen Membran identifiziert, in dem sich die Hüllproteinbande befindet. Der Bereich wird ausgeschnitten und mit TRV ON-Immunglobulin (1:40 verdünnt in Blockingpuffer) 2 h inkubiert. Der Membranstreifen wird 4 x 3 min in 150 mM NaCl gewaschen, in ein schmales Gefäß überführt, mit 3.75 ml 0.1 M Glycin-HCl, pH 2.9 überschichtet und 10 min unter Schütteln inkubiert. Die die abdissoziierten Antikörper enthaltende Lösung wird abgegossen und sofort mit 100 µl 1 M NaOH neutralisiert. Der Membranstreifen wird für die Gewinnung weiterer spezifisch gebundener TRV ON-IgGs wieder über Nacht in Blockingpuffer inkubiert und der Vorgang der Antikörperbindung und -abdissoziation wiederholt. Dies geschieht insgesamt dreimal, wobei für die Inkubation mit dem TRV ON-IgG immer dieselbe Lösung verwendet werden kann.

**b) Aufkonzentrierung der abdissoziierten TRV ON-Antikörper**

Zu 12 ml der die abdissoziierten Antikörper enthaltenden Lösung werden unter Rühren 1 Vol. gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung (80 %) langsam zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen. Die ausgefällten Antikörper werden durch 15 minütige Zentrifugation bei 6000 rpm pelletiert und in 100 µl 0.5x PBS (vgl. B 3.7.1.) gelöst. Nach einer Dialyse gegen 0.5x PBS über Nacht können die aufkonzentrierten Antikörper für immunelektronenmikroskopische Untersuchungen verwendet werden.

**3.8. Transformation mit Hilfe der Partikelkanone**

(modifiziert nach Sanford et al., 1991)

Diese Transformationsmethode verwendet kleine, mit DNA beschichtete Gold- oder Wolframkügelchen, um Fremd-DNA in Pflanzenzellen einzubringen. Diese Kügelchen werden mit Hilfe einer Helium-getriebenen Partikelkanone in die intakten Pflanzenzellen hineingeschossen. Beim Eintritt in die Zelle wird die DNA von den Partikeln abgestreift und gelangt in den Zellkern. Dort kann die eingeführte DNA in das pflanzliche Genom integrieren, oder sie wird bis zu ihrem Abbau transient im Zellkern exprimiert, so daß sich mit Hilfe dieser Methode sowohl eine stabile als auch eine transiente Transformation erreichen läßt. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß sich mit Hilfe der Partikelkanone auch Zellorganellen wie z.B. Chloroplasten transformieren lassen.

**3.8.1. Vorbereitung des Blattmaterials**

Für eine Transformation mit Hilfe der Partikelkanone werden junge, mittelgroße Blätter von *Nicotiana benthamiana* verwendet. Diese werden einzeln in Petrischalen gelegt und ihre Blattstiele mit einem kleinen Stück feuchter Watte umhüllt.

### 3.8.2. Vorbereitung der Partikel

30 mg M 17 Wolfram-Partikel werden mit 1 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol 20 sec gevortext und 10 min zum Absetzen der Partikel auf Eis stehengelassen. Der Ansatz wird 30 sec bei 4000 rpm ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, die Partikel durch 10 sec Vortexen in 500 µl sterilem Aqua<sub>dest.</sub> resuspendiert und erneut 10 min auf Eis belassen. Nach einer Zentrifugation von 30 sec bei 4000 rpm werden die Partikel in 500 µl 50 %igem sterilem Glycerin aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.8.3. Beschichtung der Partikel und Präparation der Flugscheiben

Der hier beschriebene Ansatz ist ausreichend für die Präparation von 6 Flugscheiben. 54 µl der sorgfältig resuspendierten Partikelsuspension werden unter Vortexen zu 5-10 µg hochreiner Plasmid-DNA pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nun werden nacheinander 54 µl 2.5 M CaCl<sub>2</sub>, 22 µl Spermidin und 109 µl 100 %iges Ethanol unter ständigem Vortexen zugegeben und der Ansatz nochmals 10 min auf Eis stehen gelassen. Es folgt eine Zentrifugation für 5 sec bei 1500 rpm ohne Bremse. Der Überstand wird vollständig entfernt und die beschichteten Partikel in 38 µl 100 %igem Ethanol aufgenommen. Die resuspendierten Partikel werden für 5 sec auf höchster Stufe sonifiziert und in Aliquots von je 10 µl umgehend auf ausgelegte Flugscheiben aufgebracht. Die präparierten Flugscheiben werden im Exsikkator getrocknet und dort bis Nutzung belassen.

### 3.8.4. Partikelbeschuß

(nach Biorad PDS-1000/He Vorschrift)

Die PDS-1000/He-Partikelkanone von Biorad arbeitet nach folgendem Prinzip: Der zur Beschleunigung der Partikel notwendige Druck wird erreicht, indem Helium in eine Kammer strömt, die nach unten hin von einer sogenannten Berstscheibe verschlossen ist. Je nach Typ widerstehen diese Berstscheiben einem Druck von 100-2000 psi. Für die Transformation von *Nicotiana benthamiana* werden Berstscheiben mit einem Druckwiderstand von 1450 psi verwendet.

Hat sich in der Kammer der entsprechende Druck aufgebaut, reißen die Berstscheiben, und das Gas strömt in die evakuierte Unterdruckkammer der Partikelkanone. Im 2 cm-Abstand zu den Berstscheiben befindet sich die mit den Partikeln beladene Flugscheibe. Diese wird durch die plötzliche Druckentladung stark beschleunigt und gegen ein 1 cm entferntes Metallnetz geschleudert. Während die Scheibe zurückgehalten wird, passieren die beschleunigten Partikel das Netz. Mit hoher Geschwindigkeit treffen sie auf das Zielgewebe, durchschlagen die Zellwand und werden durch das Gewebe soweit abgebremst, daß sie dort verbleiben.

Nach dem Beschuß werden die Blätter zur Expression des eingeführten Fremdgens für 24-48 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

## 3.9. Fluoreszenzmikroskopie

(nach Reichel et al., 1996; Clontech Vorschrift, 1995)

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie lassen sich in die Zelle eingebrachte, fluoreszierende Moleküle nachweisen. Diese Moleküle absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren es bei einer anderen Wellenlänge. Wird eine solche Verbindung im Bereich der absorbierten Wellenlänge bestrahlt und durch einen Filter

betrachtet, der nur für Licht der emittierten Wellenlänge durchlässig ist, so kann vor einem dunklen Hintergrund das Leuchten des Moleküls beobachtet werden.

Das Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop 20) ähnelt einem normalen Lichtmikroskop. Allerdings muß hier das von einer starken Quecksilberdampflampe (HB 0 50 W) erzeugte Licht zwei Filter passieren, bevor es zum Auge des Betrachters gelangt. Das Licht trifft zunächst auf einen sogenannten Anregungsfilter, der nur die Wellenlängen passieren läßt, die das verwendete fluoreszierende Molekül anregen. Das so gefilterte Licht wird von einem strahlenteilenden Spiegel durch das Objektiv auf das Präparat geschickt. Das vom Präparat emittierte Licht wird durch das Objektiv und den Strahlungsteiler auf einen Bandpassfilter geleitet, der gegen Licht aus dem Anregungsbereich sperrt und nur die Wellenlängen passieren läßt, die vom fluoreszierenden Molekül emittiert werden.

Für die fluoreszenzmikroskopische Detektion des GFP verwendete Filter und Spiegel von Zeiss:

Anregungsfilter	BP 450-490	läßt nur Wellenlängen im Bereich von 450-490 nm passieren
Strahlenteilender Spiegel	FT 510	leitet nur Wellenlängen oberhalb von 510 nm weiter
Bandpassfilter	HQ 535/50x	läßt nur Wellenlängen im Bereich von 510-560 nm passieren

Für die fluoreszenzmikroskopische Detektion des dsRed verwendete Filter und Spiegel der Firma AHF Analytentechnik AG :

Anregungsfilter	HQ 565/30	läßt nur Wellenlängen im Bereich von 555-575 nm passieren
Strahlenteilender Spiegel	Q 585 LP	leitet nur Wellenlängen oberhalb von 600 nm weiter
Langpassfilter	HQ 620/60	läßt nur Wellenlängen im Bereich von 595-645 nm passieren

Für die Untersuchung auf Fluoreszenz wird das Blattmaterial in einen Tropfen 1x PBS (vgl. B 3.7.1.) gegeben und unter dem Mikroskop betrachtet.

### 3.10. Agroinfektion

Die Agroinfektion ist eine schnelle und einfache Methode zur Expression von Fremdsequenzen in Pflanzen. Die zu exprimierende Sequenz wird hierzu zunächst unter Kontrolle eines geeigneten Promotors, z.B. dem 35S-Promotor aus CaMV, gestellt und diese Expressionskassette in einen Agrobakterien-Expressionsvektor eingebracht. Das Konstrukt wird nun in einen geeigneten Agrobakterienstamm transformiert. Kleine Mengen einer Flüssigkultur dieser Bakterien werden schließlich mit Hilfe einer handelsüblichen Einwegspritze mit Kanüle in die Internodien der Pflanze injiziert. Über das Leitsystem können die Agrobakterien sich nun in der gesamten Pflanze ausbreiten und für eine Expression der Fremdsequenz in den transfizierten Pflanzenzellen sorgen.

In dieser Arbeit wurde die Agroinfektion zum einen zur Testung der Autotoxizität verschiedener P8-Teilsequenzen aus PVX verwendet und zum anderen zur Überprüfung der Resistenzwirkung dieser Sequenzen unter Bedingungen, die den im transgenen System herrschenden Verhältnissen nahekommen, genutzt.

Die unter C 2.3.5. beschriebenen, auf dem Agrobakterien-Expressionsvektor pLH 9000 basierenden Konstrukte wurden in den elektrokompetenten Agrobakterienstamm GV3101 durch Elektroporation eingebracht. 10 ml LB<sub>mod</sub> wurden mit 25 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Spectinomycin und 300 µg/ml Streptomycin versetzt und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Flüssigkultur wurde bei 28°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>550</sub> von ~0.5 inkubiert.

Zur Infektion wurde sowohl *Nicotiana benthamiana* als auch *Datura stramonium* verwendet. Mit Hilfe einer 2 ml-Einwegspritze mit Kanüle (Ø 0.5 mm) wurden kleine Mengen der Flüssigkultur in die Internodien dieser Pflanzen injiziert.

### 3.11. Extraktion von Gesamt-DNA aus agroinfizierten Pflanzen

(nach Tinker et al., 1993)

#### Lösungen:

CTAB-Extraktionspuffer    2% CTAB; 1.4 M NaCl; 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0;  
20 mM EDTA

Zum Nachweis der über Agroinfektion in *Nicotiana benthamiana* und *Datura stramonium* eingebrachten Fremdsequenzen wurden Gesamt-DNA-Extrakte dieser Pflanzen einer analytischen PCR mit Fremdsequenz-spezifischen Primern unterzogen. Die Gewinnung der Gesamt-DNA aus agroinfizierten Pflanzen erfolgte nach einem Protokoll von Tinker et. al. (1993).

100 mg Blattmaterial werden in 500 µl CTAB-Extraktionspuffer homogenisiert und 1 h bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wird der Überstand in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Der Ansatz wird 30 sec gevortext und wiederum 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird einer Isopropanolfällung unterzogen (vgl. B 3.1.3.), das Pellet kurz getrocknet und in 100 µl TE oder H<sub>2</sub>O gelöst.

1 µl-Aliquots werden anschließend einer analytischen PCR unterzogen.

## C. Ergebnisse

### 1. Entwicklung eines für die Expression von Fremdgenen geeigneten viralen Vektorsystems

#### 1.1. Entwicklung eines viralen Vektorsystems auf der Basis der *Tobacco rattle virus* RNA1 und RNA2

Die Planung des Projektes sah es ursprünglich vor, daß die für die Etablierung eines Testsystems notwendigen Vollängenklone selbst hergestellt werden sollten. Als Basis sollten verschiedene Isolate des *Tobacco rattle virus* (TRV) dienen.

TRV ist der namensgebende Vertreter der Tobraviren. Natürlicherweise wird TRV durch bodenbürtige Nematoden der Gattungen *Trichodorus* und *Paratrichodorus* übertragen (Ploeg et al., 1989), kann aber im Gewächshaus ohne weiteres durch mechanische Inokulation einer geeigneten Wirtspflanze kultiviert werden. Das Virus zeichnet sich durch einen sehr weiten Wirtspflanzenkreis aus, zu dem neben zahlreichen Wildpflanzen auch eine große Anzahl an wirtschaftlich bedeutenden Kulturpflanzen zählt (Uschdraweit and Valentin, 1956; Noordam, 1956; Schmelzer, 1957). Das Genom besteht aus einzelsträngiger Plus-Strang-RNA und ist zweigeteilt. Die zwischen den einzelnen Isolaten recht stark konservierte RNA1 besitzt eine Größe von etwa 6.8 kb, während die RNA2 in Abhängigkeit vom Isolat eine sehr variable Größe zwischen 1.8-4.5 kb aufweist (*Virus taxonomy*, 2000). Die einfache mechanische Übertragbarkeit, der weite Wirtspflanzenkreis und die hohe Variabilität der TRV RNA2 als Hinweis auf eine hohe Toleranz gegenüber Modifikationen macht TRV zu einem erfolgversprechenden Kandidaten für die Anwendung als viralen Vollängenklon zur Expression von Fremdsequenzen.

Zur Herstellung der infektiösen Klone sollten die RNA1 und RNA2 der TRV-Isolate ON (Uhde et al., 1998), ORY (Sudarshana and Berger, 1998) und SP (Schmidt and Koenig, 1999) in eine cDNA umgeschrieben und unter Kontrolle des 35S-RNA-Promotors aus CaMV gebracht werden. Im Laufe der Klonierungsarbeiten ergaben sich allerdings unerwartete Schwierigkeiten. Die anfänglichen Probleme bei der für die Klonierung notwendigen Amplifikation der cDNA-Sequenz mittels PCR konnten durch die Verwendung einer spezifischen Polymerase (Taq/Pwo von Hybaid) und die Unterteilung des Genoms in mehrere Abschnitte relativ schnell gelöst werden. Die Klonierung der so gewonnenen PCR-Produkte erwies sich dagegen als äußerst schwierig und im Falle der TRV RNA1 sogar als unmöglich. Die einzelnen Teilstücke konnten zwar in den Klonierungsvektor pGEM-T integriert und in Bakterien vermehrt werden. Sobald diese Teilstücke allerdings zu einer ganzlängigen Sequenz zusammengefügt wurden, ließen sich die resultierenden Konstrukte nicht mehr in *E. coli* vermehren. Trotz zahlreicher verschiedener Klonierungsansätze und -strategien ist es lediglich gelungen, einen ganzlängigen cDNA-Klon der RNA2 des TRV-Isolats ORY zu erzeugen, der sich im nachfolgenden Infektiositätstest allerdings als nicht infektiös erwies.

Die Arbeiten zur Herstellung von TRV-Vollängenklonen wurden deshalb eingestellt und auf bereits vorhandene cDNA-Klone verschiedener anderer Viren zurückgegriffen.

## 1.2. Entwicklung eines viralen Vektorsystems auf der Basis von bereits vorhandenen Vollängenklonen verschiedener Viren

Folgende cDNA-Klone verschiedener Viren wurden auf ihre Eignung als Expressionsvektoren hin getestet: pCIYVV *Ascl*/Nla GFP, pCymMV, pPVX 201, pPVX P2A GFP und pTEV H/C (vgl. dazu auch B 2.6.2.).

Zur Vereinfachung der Insertion einer Fremdsequenz wurde in alle Konstrukte zunächst eine *Ascl*-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Dies bot den Vorteil, daß eine zu testende Fremdsequenz nicht individuell für jeden der verwendeten Vektoren vorbereitet werden mußte, sondern das gleiche Insert in jeden dieser veränderten Konstrukte eingebaut werden konnte. Für die Untersuchung ein und derselben Fremdsequenz in mehreren Vektorsystemen bedeutete dies eine enorme Arbeitserleichterung.

Ob die so veränderten cDNA-Klone in der Lage waren, die für eine effiziente Fremdgenexpression geforderten Kriterien zu erfüllen, wurde mit Hilfe des GFP (*green fluorescent protein*)-Gens untersucht. GFP ist ein monomeres Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* mit einem Molekulargewicht von 26.9 kDa und einer Länge von 238 Aminosäuren (Prasher et al., 1992). Es besitzt die Eigenschaft, bei UV- oder Blaulichtbestrahlung grün zu fluoreszieren. Über einen infektiösen cDNA-Klon exprimiertes GFP konnte somit durch eine einfache fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von infiziertem Pflanzenmaterial detektiert werden.

Desweiteren wurde die Stabilität des integrierten GFP-Gens über den gesamten Zeitraum der Infektion mit Hilfe der IC-RT-PCR beobachtet und die Infektionsrate durch gleichzeitige Inokulation mehrerer Wirtspflanzen bestimmt.

### 1.2.1. Einführung einer *Ascl*-Restriktionsschnittstelle in die zu testenden viralen cDNA-Klone

#### a) Einführung einer *Ascl*-Restriktionsschnittstelle in pCymMV

Um eine effiziente Fremdgenexpression über den auf dem *Cymbidium mosaic virus* basierenden cDNA-Klon zu ermöglichen, wurde eine ähnliche Expressionsstrategie angestrebt wie die im Falle des pPVX P2A GFP verwendete (vgl. hierzu B 2.6.2. d)). Hierzu wurde neben einer *Ascl*-Restriktionsschnittstelle die Nukleotidsequenz des P2A aus FMDV in die virale Sequenz eingeführt. Als Insertionsort wurde der Bereich zwischen der CymMV-Hüllproteinpromotor-Sequenz und dem nachfolgenden Hüllproteingen gewählt. Die hier verwendete Nukleotidsequenz für das P2A stammte aus pPVX P2A GFP. Da diese nur wenige Nukleotide umfasst und so eine alleinige Klonierung mit Schwierigkeiten verbunden wäre, wurde sie zusammen mit dem GFP-Gen übertragen. Hierzu wurde zunächst ein ca. 1970 bp umfassendes Teilstück der pCymMV-Sequenz (Nt 4320-6278) mit Hilfe der Oligonukleotide cb3/cb4 herausamplifiziert und in den Vektor pSBET b über die primergenerierten Schnittstellen *NheI*/*Bam*HI einkloniert (→ pSBETb cb3/cb4). Dieser Schritt war notwendig, da neben der für die folgende Klonierung wichtigen *PvuII*-Restriktionsschnittstelle im 5'-Bereich des Hüllproteingens (Nt 5505) zwei weitere *PvuII*-Schnittstellen innerhalb der auf pUC18-basierenden Vektorsequenz vorkommen. Aus diesem Grund wurde auch pSBET b als Klonierungsvektor gewählt. Das eigentlich zur Expression in Bakterien vorgesehene Konstrukt ist kein Derivat der pUC-Serie und trägt daher keine *PvuII*-Schnittstellen.

Parallel dazu wurde mit Hilfe der Oligonukleotide cb mut 1 und cb mut 2 die Sequenz des GFP-Gens zusammen mit der dahinterliegenden P2A-Gensequenz aus pPVX P2A GFP herausamplifiziert. cb mut 1 fügt an die 5'-Sequenz des GFP-Gens die

Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme PvuII und AscI an, während cb mut 2 am 3'-Terminus des P2A-Gens greift und dort die leicht veränderte 5'-Sequenz des CymMV-Hüllproteingens bis einschließlich zu der darin enthaltenen PvuII-Schnittstelle ergänzt. Die Änderungen des CymMV-Hüllproteingens-Teilstücks bestanden in einem Austausch der jeweils dritten Base eines Codons in der Weise, daß lediglich die Nukleotidsequenz aber nicht die dadurch kodierte Aminosäuresequenz verändert wurde. Dies sollte die Möglichkeit der Rekombination zwischen den im neuen Konstrukt doppelt vorkommenden Hüllproteinbereichen (Sequenz für die ersten 8 Aminosäuren ohne Startcodon) herabsetzen. Die amplifizierte Sequenz wurde über PvuII in den entsprechend vorbereiteten pSBETb cb3/cb4 einkloniert und das so veränderte Teilstück über NheI/SmaI in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Ursprungsvektor pCymMV zurückgebracht. So ergab sich das in Abb. 8 dargestellte Konstrukt pCymMV P2A GFP.

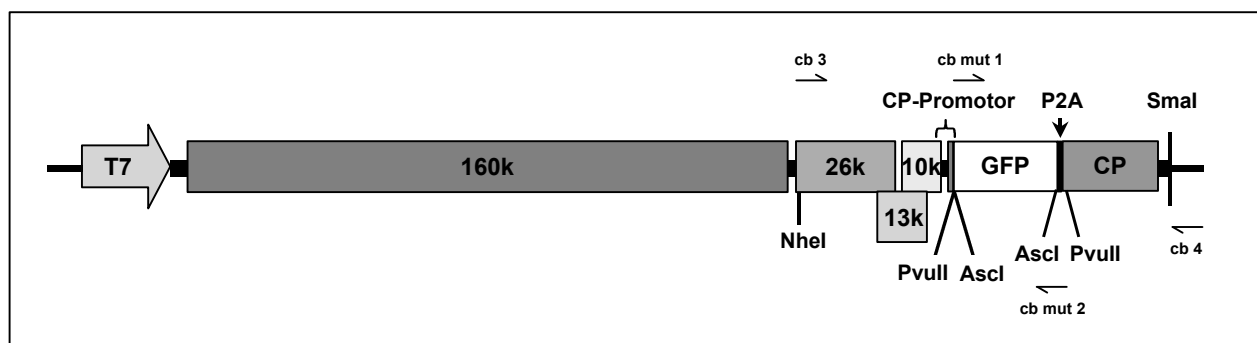


Abb. 8: Schematische Darstellung des infektiösen Klon pCymMV P2A GFP

## b) Einführung einer AscI-Restriktionsschnittstelle in pPVX 201

Zur Einführung einer AscI-Schnittstelle in pPVX 201 wurden lediglich einige Nukleotide der Sequenz zwischen den verdoppelten Hüllproteinpromotoren mit Hilfe eines *mismatch*-Primers so verändert, daß eine AscI-Erkennungssequenz entstand.

Hierzu wurde aus der pPVX 201-Sequenz mit Hilfe der Oligonukleotide px mut1/px3 ein ca. 860 bp umfassendes Teilstück (Nt 5656-6512) herausamplifiziert und in pGEM-T einkloniert. Dieses Teilstück trug in seinem 5'-Bereich nun die durch px mut1 generierte AscI-Schnittstelle. Die Umklonierung der veränderten Sequenz erfolgte über die natürlicherweise in der pPVX 201-Sequenz vorkommenden NheI-Schnittstellen bei Nt 5662 und Nt 5739. Dies resultierte schließlich in dem Konstrukt pPVX 201 AscI (vgl. Abb. 9).

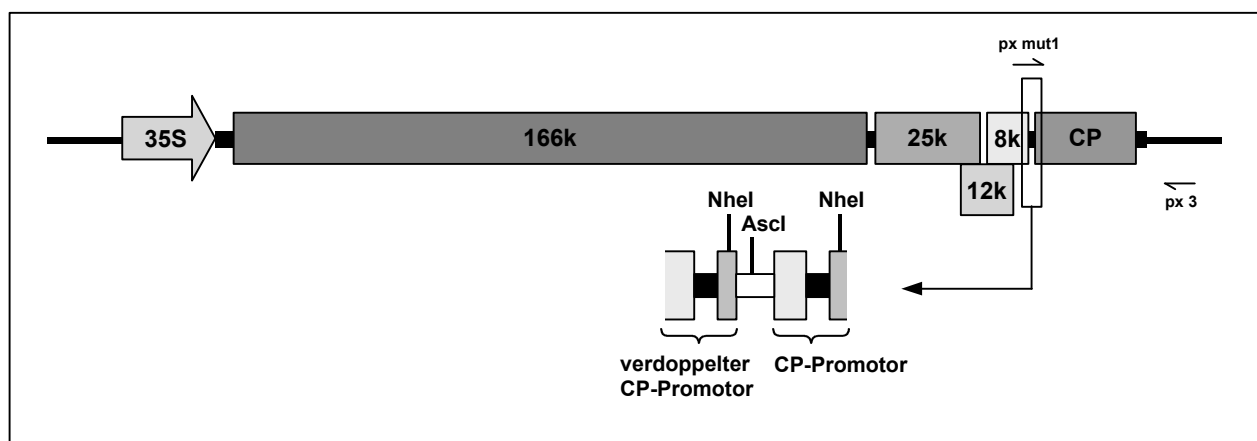


Abb. 9: Schematische Darstellung des infektiösen cDNA-Klon pPVX 201 AscI

### c) Einführung einer *Ascl*-Restriktionsschnittstelle in pPVX P2A

Für die Einführung einer *Ascl*-Schnittstelle in pPVX P2A wurden die Restriktionsschnittstellen für *BspEI* und *XmaIII* genutzt, über die bereits das im pPVX P2A GFP integrierte GFP-Gen einkloniert worden ist. Die ursprüngliche GFP-Gensequenz wurde mit diesen Enzymen aus dem Ausgangsvektor herausgeschnitten und durch eine mit den Oligonukleotiden GFP4/GFP5 amplifizierte neue GFP-Gensequenz ersetzt. Diese aus dem Plasmid pUC19 mGFP4 stammende Sequenz besaß zwar ein Start- aber kein Stopcodon, so daß sich ein durchgehendes Leserraster zusammen mit dem dahinterliegenden Hüllproteingen ergab. Darüberhinaus befand sich sowohl 5'- als auch 3'-terminal eine primergenerierte *Ascl*-Erkennungssequenz, über die das jetzige Insert jederzeit durch ein beliebiges anderes ausgetauscht werden kann.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, daß ein einkloniertes Insert stets ein Startcodon mitbringen muß, um eine Translation der hinter dem Hüllproteinpromotor liegenden Sequenzen zu ermöglichen. Folglich ist ein pPVX P2A-Konstrukt ohne jegliches Insert nicht infektiös, da das hier vorliegende PVX-Hüllproteingen aufgrund der 5'-terminalen Verkürzung selbst kein Startcodon trägt und sich ohne das Vorhandensein von PVX-Hüllprotein keine Infektion ausbilden kann. Gleichermäßen führt auch die Unterbrechung des durchgehenden Leserasters durch ein mit dem Insert eingeführtes Stopcodon zu einem Ausbleiben der Infektion. Aus diesem Grund ist bei der Einklonierung von Fremdsequenzen stets darauf zu achten, daß diese 1. ein Startcodon besitzen, 2. immer im richtigen Leseraster mit dem nachgeschalteten Hüllproteingen liegen und 3. kein Stopcodon aufweisen. Gleiches gilt auch für die auf pCymMV P2A *Ascl* basierenden Konstrukte.

Das aus diesen Klonierungsarbeiten hervorgegangene Konstrukt wurde als pPVX P2A *Ascl* GFP bezeichnet (vgl. Abb. 10).

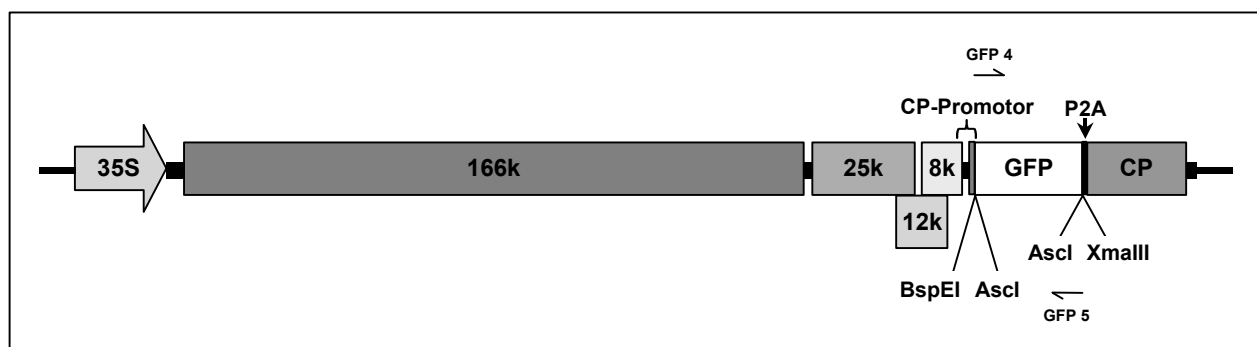


Abb. 10: Schematische Darstellung des infektiösen cDNA-Klons pPVX P2A *Ascl* GFP

### d) Einführung einer *Ascl*-Restriktionsschnittstelle in pTEV H/C

Für die Einführung einer *Ascl*-Schnittstelle in pTEV H/C wurde das „QuikChange Site-directed Mutagenesis“-Kit von Stratagen verwendet. Als Mutageneseprimer dienten die Oligonukleotide te mut1 und te mut2, die die virale Sequenz im bereits veränderten 5'-terminalen Bereich des H/C-Protease-Gens durch einzelne Nukleotidaustausche so mutierten, daß eine *Ascl*-Erkennungssequenz entstand.

Zur Erleichterung der Mutagenese wurde zunächst ein ca. 1480 bp umfassendes Fragment über natürlicherweise in der TEV-Sequenz vorkommende *XbaI*-Schnittstellen herausgeschnitten und in den entsprechend vorbereiteten Vektor pRT 103 ligiert.



Dieses Konstrukt wurde dann zur PCR-gestützten Mutagenese verwendet und das mutierte XbaI-Fragment schließlich in den pTEV H/C zurückgebracht, wodurch sich das Konstrukt pTEV H/C Ascl ergab (vgl. Abb. 11).

Bei der Integration eines Fremdgens in diesen Vektor ist zu beachten, daß das Insert kein Stopcodon aufweist und im gleichen Leseraster wie die virale Sequenz eingebaut wird, da die Translation der TEV-Sequenz als Polyprotein erfolgt und sowohl ein Stopcodon als auch ein falsches Leseraster zu einer aberranten Translation und damit zum Ausbleiben der Infektion führen würde.

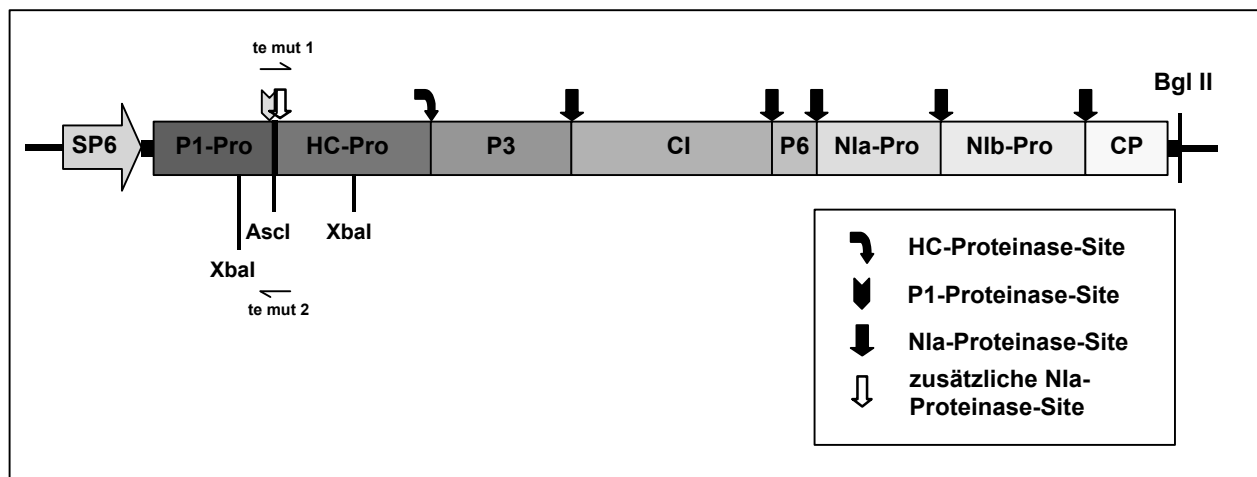


Abb. 11: Schematische Darstellung des infektiösen cDNA-Klons pTEV H/C Ascl

### 1.2.2. Insertion der GFP-Gensequenz in die verschiedenen viralen cDNA-Klone

Soweit das GFP-Gen nicht bereits im Zuge der Einführung der Ascl-Restriktionschnittstelle in die viralen cDNA-Klone integriert wurde, wurde die GFP-Gensequenz aus pUC19 mGFP4 amplifiziert, in den Vektor pGEM-T eingebracht, mit Ascl herausgeschnitten und in das entsprechende cDNA-Konstrukt umkloniert. Zur Einklonierung des GFP-Gens in pPVX 201 Ascl wurde die Primerkombination GFP1/GFP2 (mit Start- und Stopcodon) verwendet, während für pTEV H/C Ascl die Oligonukleotide GFP1/GFP3 (mit Startcodon, ohne Stopcodon) gewählt wurden.

### 1.2.3. Bestimmung der Infektionsrate der verschiedenen viralen cDNA-Klone

Für die Bestimmung der Infektionsrate wurden jeweils fünf Wirtspflanzen inokuliert und der Anteil an infizierten und nicht-infizierten Pflanzen durch Testung der Viruskonzentration im ELISA dokumentiert. Die Zahl der getesteten Pflanzen wurde bewußt gering gehalten, da eine Infektionsrate von weniger als 1/5 der inokulierten Pflanzen für eine großangelegte Testung von Fremdsequenzen mit Hilfe eines viralen cDNA-Klons nicht praktikabel wäre.

Tab. 3: Infektionsraten verschiedener viraler cDNA-Klone mit über *Ascl* integrierter GFP-Gensequenz

cDNA-Klon basierend auf	infizierte Pflanzen	nicht infizierte Pflanzen
pCIYVV	4	1
pCymMV	0	5
pPVX 201	4	1
pPVX P2A	5	0
pTEV H/C	4	1

Außer dem auf pCymMV basierenden cDNA-Klon zeigten alle getesteten Konstrukte eine gute bis sehr gute Infektiösität (vgl. Tab. 3). Da im Falle des pCymMV P2A GFP auch in weiteren Versuchen keine Infektiösität festgestellt werden konnte und bereits das Ursprungs-konstrukt eine nur sehr niedrige Infektiösität aufwies, wurde pCymMV als Grundlage für ein Expressionssystem nicht weiter genutzt.

#### 1.2.4. Stabilität des Inserts

Zum Nachweis der Insertstabilität wurde von einer infizierten Pflanze im Abstand von 4 Tagen ab dem Auftreten der ersten Symptome mit Hilfe eines Korkbohrers Blattmaterial abgenommen, wobei immer systemisch infizierte Blätter mit gerade sichtbaren Symptomen beprobt wurden.

Mit Hilfe der IC-RT-PCR wurde das Vorhandensein der GFP-Gensequenz in der viralen Sequenz überprüft.

##### a) Stabilität des GFP-Inserts in pCIYVV *Ascl*/*Nla*

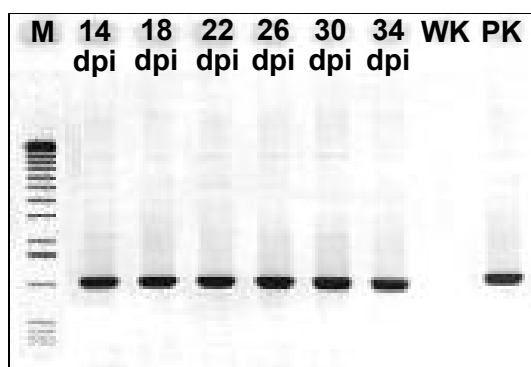


Abb. 12:

Elektrophoretische Auftrennung (1% Agarose) verschiedener IC-RT-PCR-Produkte zur Testung der Insertstabilität in pCIYVV *Ascl*/*Nla* GFP auf *Chenopodium quinoa*.

Getestet wurden Proben 14-34 Tage nach Inokulation

**M**: 1 kb Ladder; **WK**: Wasserkontrolle;

**PK**: Positivkontrolle mit Plasmid-DNA (pCIYVV *Ascl*/*Nla* GFP) als Template

verwendete Primerkombination: cy2/cy4

erwartete Produktgröße: ~1050 bp

Ca. 14 Tage nach Inokulation traten erste Symptome in Form von wenigen punktförmigen Chlorosen auf. In diesen Läsionen konnte mit Hilfe der IC-RT-PCR über den gesamten Probenzeitraum das GFP-Insert als Teil der CIYVV-Sequenz nachgewiesen werden (vgl. Abb. 12). Die Stabilität des GFP-Inserts war damit gegeben.

### b) Stabilität des GFP-Inserts in pPVX 201 Ascl

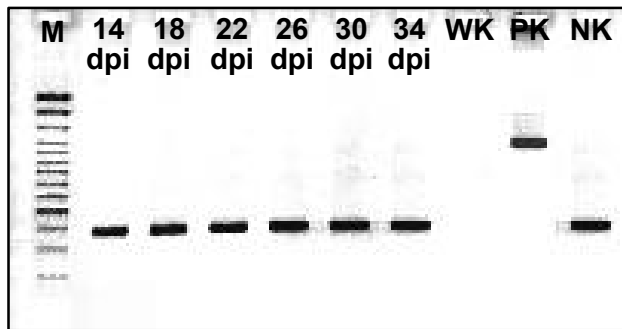


Abb. 13:

Elektrophoretische Auftrennung (2 % Agarose) verschiedener IC-RT-PCR-Produkte zur Testung der Insertstabilität in pPVX 201 Ascl GFP auf *N. benthamiana*.

Getestet wurden Proben 14-34 Tage nach Inokulation

**M:** 100 bp Plus Ladder; **WK:** Wasserkontrolle;

**PK:** Positivkontrolle mit Plasmid-DNA (pPVX 201 Ascl GFP) als Template; **NK:** Negativkontrolle mit Plasmid-DNA (pPVX 201 Ascl) als Template

verwendete Primerkombination: px1/px2

erwartete Produktgröße: ~1115 bp

Die mit pPVX 201 Ascl GFP infizierte Pflanze zeigte 14 Tage nach Inokulation die ersten Symptome - im Vergleich zu einer Infektion mit dem Ursprungskonstrukt pPVX 201 (erste Symptome 8-10 dpi) zu einem recht späten Zeitpunkt. Eine Analyse der viralen Sequenz durch eine IC-RT-PCR mit der das GFP-Insert umfassenden Primerkombination px1/px2 offenbarte, daß in allen Abnahmen statt der erwarteten 1115 bp-Bande lediglich ein Produkt von ~385 bp amplifiziert wurde. Die Produktgröße stimmte folglich mit einer für pPVX 201 Ascl ohne Insert erwarteten Größe von ~385 bp (vgl. Abb. 13) überein. Die GFP-Gensequenz schien durch Rekombination während des Infektionsprozesses verloren gegangen zu sein, was auch das verzögerte Auftreten der ersten Symptome erklären würde. Die Insertstabilität war damit nicht gegeben.

### c) Stabilität des GFP-Inserts in pPVX P2A Ascl

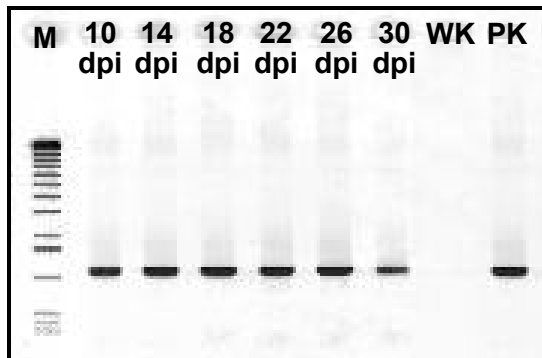


Abb. 14:

Elektrophoretische Auftrennung (1% Agarose) verschiedener IC-RT-PCR-Produkte zur Testung der Insertstabilität in pPVX P2A Ascl GFP auf *N. benthamiana*.

Getestet wurden Proben 14-34 Tage nach Inokulation

**M:** 1 kb Ladder; **WK:** Wasserkontrolle;

**PK:** Positivkontrolle mit Plasmid-DNA (pPVX P2A Ascl GFP) als Template

verwendete Primerkombination: px1/px2

erwartete Produktgröße: ~1120 bp

In einem mit dem Ursprungskonstrukt pPVX P2A GFP vergleichbaren Zeitraum von 8-10 Tagen traten bei der mit pPVX P2A Ascl GFP infizierten Pflanze die ersten sichtbaren Symptome auf. Die IC-RT-PCR zeigte, daß das GFP-Insert über den gesamten Probenzeitraum vollständig erhalten blieb (vgl. Abb. 14). In allen Proben ergab sich die erwartete Produktgröße von ~1120 bp. Die Insertstabilität war damit gegeben.

### d) Stabilität des GFP-Inserts in pTEV H/C Ascl

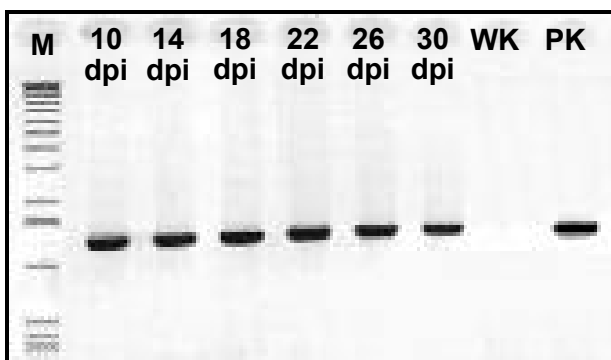


Abb. 15:

Elektrophoretische Auftrennung (1% Agarose) verschiedener IC-RT-PCR-Produkte zur Testung der Insertstabilität in pTEV Ascl GFP auf *N. benthamiana*.

Getestet wurden Proben 10-30 Tage nach Inokulation

**M:** 1 kb Ladder; **WK:** Wasserkontrolle;

**PK:** Positivkontrolle mit Plasmid-DNA (pTEV H/C Ascl GFP) als Template

verwendete Primerkombination: te1/te2

erwartete Produktgröße: ~1210 bp

Die ersten Symptome waren im Falle des pTEV H/C Ascl GFP ca. 8-10 Tage nach Inokulation zu beobachten und damit ebenfalls in einem mit dem Ursprungskonstrukt vergleichbaren Zeitraum. Auch das Insert blieb - wie die Ergebnisse der IC-RT-PCR mit der insertumfassenden Primerkombination te1/te2 zeigten (vgl. Abb. 15) - bis zu 30 Tagen nach Inokulation vollständig erhalten. Die Stabilität des Inserts war gewährleistet.

### 1.2.5. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der GFP-Expression

Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis der GFP-Expression über die zu testenden viralen cDNA-Klone wurde von infizierten Pflanzen Blattmaterial mit gut sichtbaren Symptomen auf GFP-Fluoreszenz hin untersucht.

#### a) GFP-Expression über pCIYVV Ascl/Nla

In den mit pCIYVV Ascl/Nla GFP infizierten Pflanzen war eine deutliche GFP-Fluoreszenz zu erkennen, die sich allerdings auf die wenigen, durch das Virus erzeugten, punktförmigen Läsionen beschränkte (vgl. Abb. 16). Im Rahmen der Diplomarbeit von Korowski (2001) durchgeführte Untersuchungen haben ebenfalls gezeigt, daß das Virus *Chenopodium quinoa* zwar systemisch infizieren konnte, daß die Viruskonzentration aber ausschließlich in den punktförmigen Läsionen in einem serologisch nachweisbaren Bereich lag. Die Expression einer Fremdsequenz erfolgte demnach nur in den sehr eng begrenzten Läsionen und damit in Bezug auf die gesamte Pflanze auch nur in geringem Umfang. Daher eignete sich das auf pCIYVV-basierende System trotz hoher Insertstabilität und guter Fremdgenexpression nicht für die geplanten Arbeiten.

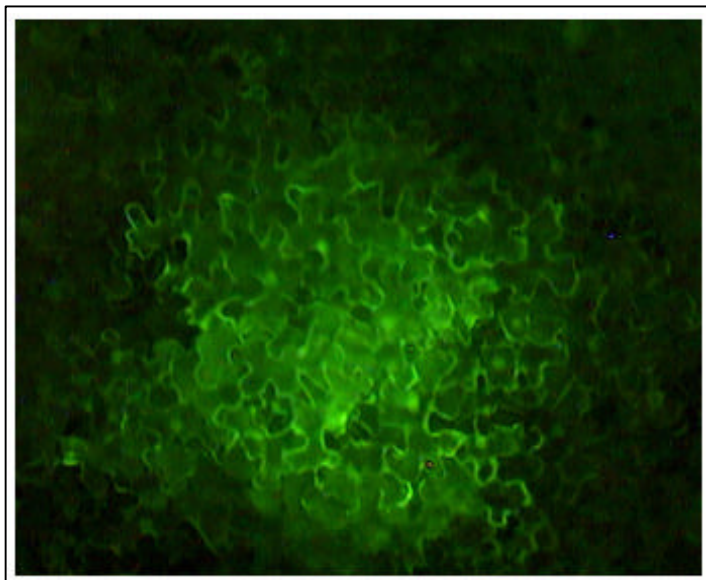


Abb. 16:  
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit pCIYVV Ascl/Nla GFP infizierten *Chenopodium quinoa*-Pflanze

#### b) GFP-Expression über pPVX 201 Ascl

In der mit pPVX 201 Ascl GFP infizierten Pflanze konnte keine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden (vgl. Abb. 17). Das Fehlen der GFP-Expression trotz vorhandener Infektiosität war darauf zurückzuführen, daß das GFP-Insert während der Ausbildung der PVX-Infektion verloren gegangen ist (vgl. C 1.2.4. b)).

Dieses Vektorsystem eignete sich aufgrund der fehlenden Insertstabilität nicht für eine effiziente Expression von Fremdsequenzen, so daß mit diesem Konstrukt keine weiteren Arbeiten durchgeführt wurden.

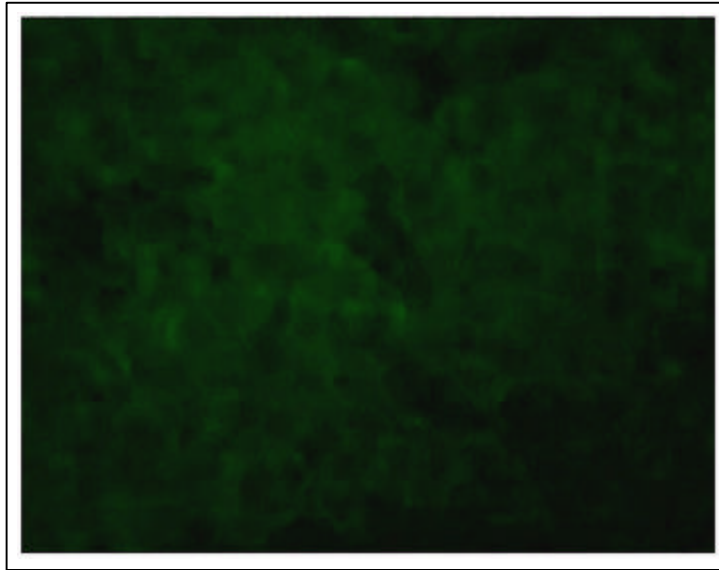


Abb. 17:  
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme  
einer mit pPVX 201 Ascl GFP infizierten  
*N. benthamiana*-Pflanze

### c) GFP-Expression über pPVX P2A Ascl

In den durch pPVX P2A Ascl GFP infizierten Bereichen war deutlich eine typische GFP-Fluoreszenz mit starker Kernlokalisierung zu beobachten (vgl. Abb. 18). Folglich wurde GFP in den infizierten Zellen exprimiert und verblieb dort offensichtlich über einen längeren Zeitraum, ohne abgebaut zu werden.

Zusammenfassend wiesen alle Ergebnisse darauf hin, daß sich das pPVX P2A-System für eine effiziente Expression von Fremdproteinen eignet.

Dieses System wurde daher für die Testung weiterer Fremdsequenzen verwendet.

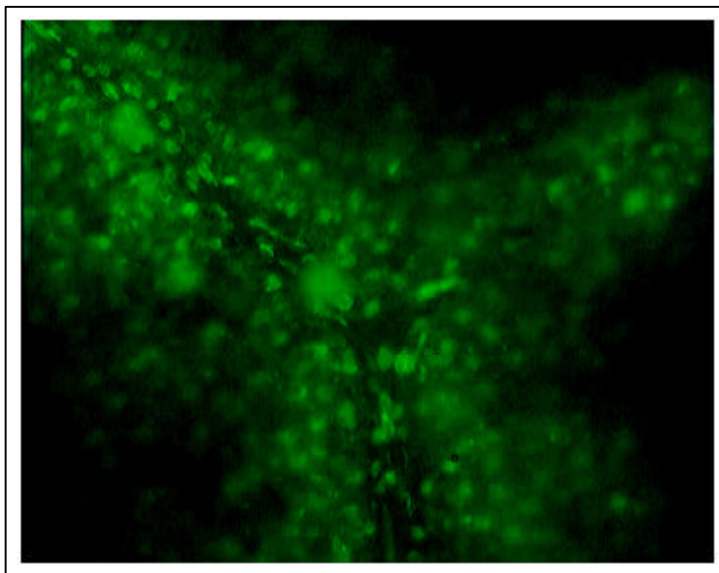


Abb. 18:  
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme  
einer mit pPVX P2A Ascl GFP infizierten  
*Datura stramonium*-Pflanze

### d) GFP-Expression über pTEV H/C Ascl

Auch hier zeigte sich in den durch pTEV H/C Ascl GFP infizierten Bereichen eine deutliche GFP-Fluoreszenz mit starker Kernlokalisierung (vgl. Abb. 19). Dies deutete ebenfalls auf eine gute Expression und Stabilität des GFP in den infizierten Zellen hin. Somit schien das pTEV H/C-System für eine Expression von Fremdproteinen geeignet zu sein. Daher wurde auch dieses System für weitere Untersuchungen verwendet.

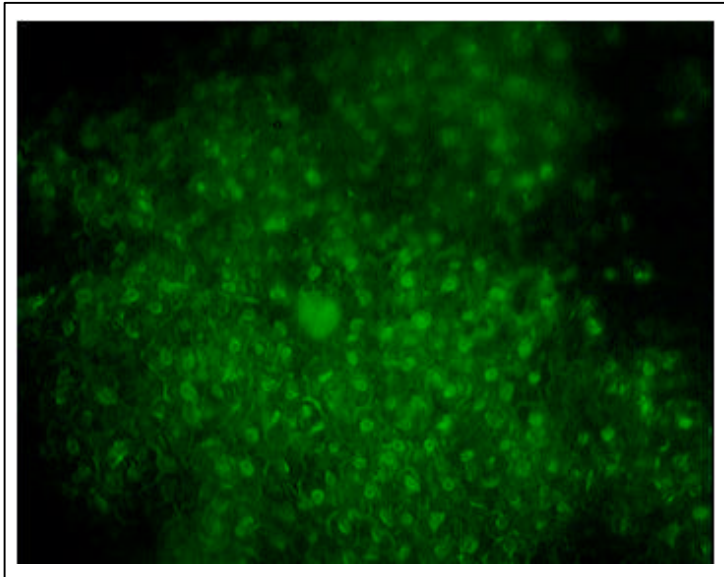


Abb. 19:  
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme  
einer mit pTEV H/C Ascl GFP infizierten  
*N. benthamiana*-Pflanze

## 2. Expression von Fremdsequenzen mit möglichem antiviralem Potential über pPVX P2A Ascl

Virale Sequenzen haben sich in zahlreichen Untersuchungen in transgenen Systemen als vielversprechende Ressource für Sequenzen mit virushemmender Wirkung erwiesen (vgl. A 1.3.). Daher wurden zunächst verschiedene Bereiche des PVX-Genoms auf ihre Fähigkeit, die entstehende PVX-Infektion zu beeinflussen, untersucht. Dazu gehörten unterschiedliche Teilsequenzen des Replikasegens, die ORF's des *Triple gene blocks*, die für die Transportproteine P25, P12 und P8 kodieren, sowie die Sequenz des PVX-Hüllproteins.

In einem zweiten Ansatz wurden die Hüllproteinsequenzen verschiedener anderer Viren auf ihr antivirales Potential gegenüber PVX getestet.

Zur Vereinfachung der Bezeichnung wurden im folgenden die Zusätze ‚P2A‘ und ‚Ascl‘ im Namen der neuen Konstrukte weggelassen. Für allen nachfolgend beschriebenen Konstrukte gilt auch ohne zusätzliche Erwähnung, daß sie auf pPVX P2A Ascl basieren.

### 2.1. Untersuchung des antiviralen Potentials verschiedener Bereiche des PVX-Genoms

#### 2.1.1. Expression verschiedener Teilbereiche des P166

In mehreren Veröffentlichungen wurden für verschiedene Viren Replikase-vermittelte Resistenzen in transgenen Pflanzen beschrieben (Anderson et al., 1992; Audy et al., 1994; Carr and Zaitlin, 1991; Carr et al., 1994; Golemboski et al., 1990; Jones et al., 1998; Sijen et al., 1995). Auch durch Expression der mutmaßlichen Replikase-Komponente aus PVX konnten erfolgreich resistente Tabakpflanzen erzeugt werden (Braun and Hemenway, 1992; Longstaff et al., 1993; Mueller et al., 1995). Daher bietet es sich an, den ORF1 des PVX als Quelle für Sequenzen mit möglichem antiviralem Potential zu nutzen.

Hierzu wurde der ORF1 willkürlich in verschiedene Teilstücke eingeteilt, welche dann in pPVX P2A Ascl eingebracht und in *Datura stramonium* exprimiert wurden.

Für die Amplifikation der verschiedenen Teilstücke wurde das Konstrukt pPVX P2A Ascl als Matrizen-DNA zusammen mit den in Tab. 4 angegebenen Primerkombinationen benutzt. Es wurden folgende Konstrukte erstellt:

Tab. 4: Beschreibung der pPVX P2A-Konstrukte mit verschiedenen Teilstücken des für das 166k-Protein (P166) kodierenden ORF1 aus PVX

pPVX P2A Ascl mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
px 166k 1	px 166k 1/2	Aminosäuren 1-191 des P166
px 166k 2	px 166k 3/4	Aminosäuren 185-362 des P166
px 166k 3	px 166k 17/ 4	Aminosäuren 255-362 des P166
px 166k 4	px 166k 17/19	Aminosäuren 255-463 des P166
px 166k 5	px 166k 5/6	Aminosäuren 358-556 des P166
px 166k 6	px 166k 5/19	Aminosäuren 358-463 des P166
px 166k 7	px 166k 18/20	Aminosäuren 464-616 des P166
px 166k 8	px 166k 18/6	Aminosäuren 464-556 des P166
px 166k 9	px 166k 7/8	Aminosäuren 552-718 des P166
px 166k 10	px 166k 7/20	Aminosäuren 552-616 des P166
px 166k 11	px 166k 9/10	Aminosäuren 713-907 des P166
px 166k 12	px 166k 21/10	Aminosäuren 782-907 des P166
px 166k 13	px 166k 21/23	Aminosäuren 782-991 des P166
px 166k 14	px 166k 11/23	Aminosäuren 904-991 des P166
px 166k 15	px 166k 11/12	Aminosäuren 904-1113 des P166
px 166k 16	px 166k 22/24	Aminosäuren 992-1205 des P166
px 166k 17	px 166k 22/12	Aminosäuren 992-1113 des P166
px 166k 18	px 166k 13/24	Aminosäuren 1108-1205 des P166
px 166k 19	px 166k 13/14	Aminosäuren 1108-1259 des P166
px 166k 20	px 166k 15/16	Aminosäuren 1254-1456 des P166

Jeweils 5 µg dieser Konstrukte wurden auf *Datura stramonium*-Pflanzen abgerieben. Die Symptombildung wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Inokulation dokumentiert und die Viruskonzentration in inokulierten sowie in systemisch infizierten Blättern 14 Tage nach Inokulation mittels ELISA bestimmt.

Tab. 5: Zusammenfassung der nach Inokulation mit verschiedenen pPVX-Konstrukten auftretenden Symptombilder auf *Datura stramonium*.

Die Beurteilung ergab sich aus dem Gesamtbild der über 21 Tage dokumentierten Symptombesobachtungen. Die Symptomstärke wurde durch direkten Vergleich der Symptomausprägungen in den mit verschiedenen Konstrukten inokulierten Pflanzen bestimmt.

Hierbei galt: (1) - sehr schwach, kaum sichtbar; 1 - schwach; 2 - mittel; 3 - stark; 4 - sehr stark, () - nur in geringem Maße.

\*) keine sichtbaren Symptome, aber positive ELISA-Werte

pPVX P2A Ascl mit	Symptombildung				
	Stärke	Nekrosen	Chlorosen	Blattrollen	Blasenbildung
px 166k 1	(1) <sup>*)</sup>	-	-	-	-
px 166k 2	3	✓	✓	✓	✓
px 166k 3	2	✓	✓	✓	-
px 166k 4	3	✓	✓	✓	✓
px 166k 5	(1) <sup>*)</sup>	-	-	-	-
px 166k 6	2	-	✓	✓	✓
px 166k 7	3	✓	✓	✓	✓

Fortsetzung Tab. 5: nächste Seite

Fortsetzung Tab. 5

pPVX P2A Ascl mit	Symptombildung				
	Stärke	Nekrosen	Chlorosen	Blatt- rollen	Blasen- bildung
px 166k 8	2	✓	✓	✓	-
px 166k 9	3	✓	✓	✓	✓
px 166k 10	3	✓	✓	✓	✓
px 166k 11	3	✓	✓	✓	✓
px 166k 12	2	✓	✓	✓	✓
px 166k 13	4	✓	✓	✓	✓
px 166k 14	2	✓	✓	✓	-
px 166k 15	2	✓	✓	✓	-
px 166k 16	(1)	-	(✓)	-	-
px 166k 17	3	✓	✓	✓	✓
px 166k 18	(1)	-	(✓)	-	-
px 166k 19	1	-	✓	-	-
px 166k 20	4	✓	✓	✓	✓
ATG	2-3	(✓)	✓	✓	✓

Es zeigte sich, daß die Symptomausprägung in den mit den verschiedenen pPVX P2A 166k-Konstrukten infizierten Pflanzen teilweise sehr stark vom normalen Phänotyp abwich (vgl. Tab. 5). Als ‚normal‘ galt hier - wie auch in den folgenden Untersuchungen - ein Phänotyp wie er durch das Konstrukt pPVX P2A ATG, welches kein Insert trägt, verursacht wurde (vgl. Tab. 5).

Die Positionen der verschiedenen Teilbereiche in Zusammenhang mit den durch sie verursachten Symptombilder wurden noch einmal in Abb. 20 zusammengefasst.

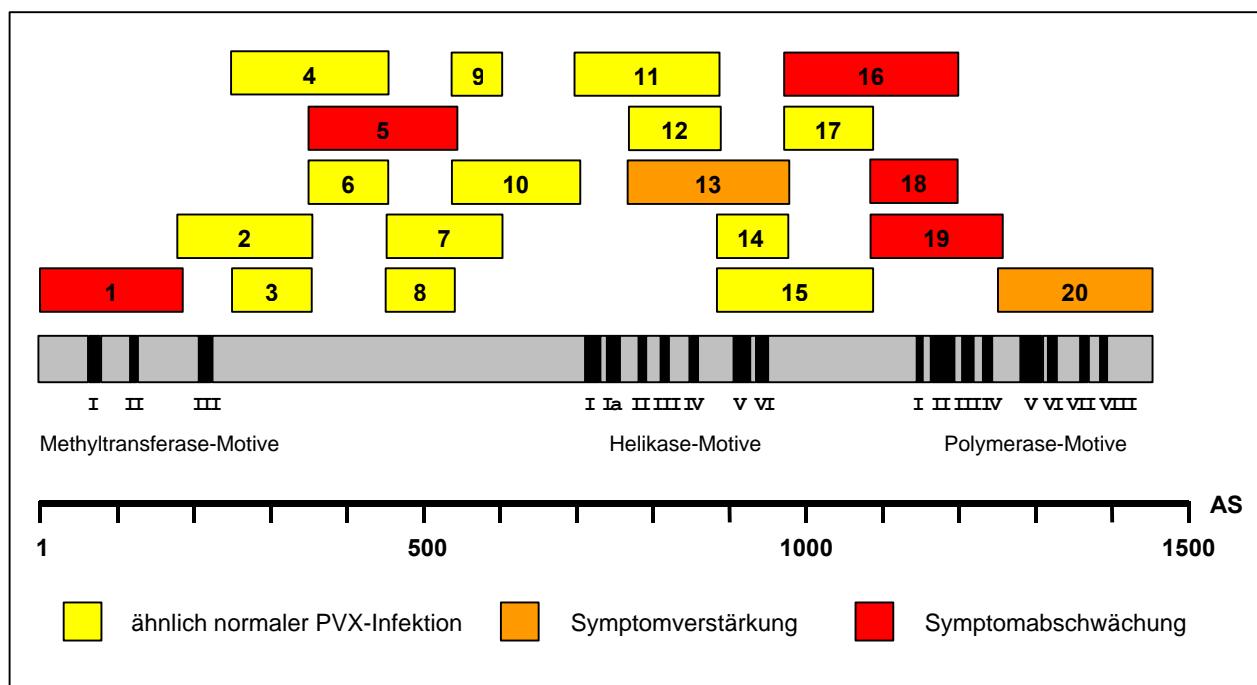


Abb. 20: Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen über pPVX P2A Ascl in *Datura stramonium* exprimierten Bereiche des P166 aus PVX im Zusammenhang mit dem dadurch verursachten Symptombild.

Die Nummerierung der verschiedenen Abschnitten entspricht der Nummerierung der einzelnen px166k-Teilstücke in C 2.1.1. Tab. 4.



Der Großteil der untersuchten Teilsequenzen hatte keinen offensichtlichen Einfluß auf die Symptomausprägung (Abb. 20: gelb markierte Abschnitte). In zwei Bereichen konnte eine Symptomverstärkung (Abb. 20: orange markierte Abschnitte) und in fünf Fällen eine deutliche Symptomabschwächung beobachtet werden (Abb. 20: rot markierte Abschnitte).

Die im C-terminalen Bereich positionierten Teilstücke 16, 18 und 19 riefen alle einen extrem schwachen Phänotyp mit kaum sichtbaren Symptomen hervor. Verantwortlich für dieses Phänomen schien ein in allen drei Sequenzen vorhandener, lediglich 100 Aminosäuren umfassender Bereich im vorderen Teil der Polymerase-Region zu sein.

Keinerlei sichtbare Symptome in den infizierten Pflanzen produzierten ein die Methyltransferase-Motive I und II umfassendes Teilstück am äußersten N-Terminus des P166 (1) und ein weiteres Teilstück im vorderen Drittel im Bereich zwischen den Methyltransferase-Motiven und den Helikase-Motiven (5). Eine Unterteilung des zuletzt genannten Teilstücks in zwei Einheiten (6 und 8) führte zu einem Verlust der für diesen Bereich beobachteten Hemmwirkung.

Ähnliches traf für die symptomverstärkende Teilsequenz im die Helikase-Motive II-VIII umfassenden dritten Viertel des Replikasegens (13) zu. Auch hier verursachten die beiden durch Teilung dieser Sequenz entstandenen Einheiten (12 und 14) lediglich einen normalen Phänotyp.

Ein auffälliges Merkmal aller pPVX P2A 166k-infizierten Pflanzen war, daß die Viruskonzentration unabhängig vom jeweilig verursachten Phänotyp immer im Bereich des für eine normale PVX-Infektion üblichen Wertes lag. Dies deutete darauf hin, daß weder Virusreplikation noch systemische Ausbreitung durch die Expression der verschiedenen Teilstücke beeinträchtigt wurde.

### 2.1.2. Expression der verschiedenen Komponenten des *Triple gene blocks*

In einigen Veröffentlichungen konnte bereits gezeigt werden, daß sich mit Hilfe der verschiedenen Komponenten des *Triple gene blocks* eine Resistenz gegenüber PVX oder anderen Viren in transgenen Pflanzen erzeugen ließ (vgl. A 3.3.2.). Somit schien es interessant, dieses im Zusammenhang mit dem pPVX P2A-System genauer zu untersuchen. Dazu wurden zunächst sowohl die ganzlängigen Sequenzen als auch bestimmte Teilbereiche der einzelnen Gene in pPVX P2A Ascl eingebracht und in *Datura stramonium* exprimiert.

Folgende Konstrukte wurden unter Verwendung der pPVX P2A-Sequenz als Matrizen-DNA und den in Tab. 6 genannten Primerkombinationen erstellt:

Tab. 6: Beschreibung der pPVX P2A-Konstrukte mit verschiedenen für die TGB-Proteine P25, P12 und P8 kodierenden Bereichen

pPVX P2A Ascl mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
<b>px 25k 1-226</b>	px 25k 1/2	Aminosäuren 1-226 des P25
<b>px 25k 1-173</b>	px 25k 1/6	Aminosäuren 1-173 des P25
<b>px 25k 1-92</b>	px 25k 1/4	Aminosäuren 1-92 des P25
<b>px 25k 87-226</b>	px 25k 3/2	Aminosäuren 87-226 des P25
<b>px 25k 87-173</b>	px 25k 3/6	Aminosäuren 87-173 des P25
<b>px 25k 123-226</b>	px 25k 5/2	Aminosäuren 123-226 des P25
<b>px 12k 1-115</b>	px 12k 1/2	Aminosäuren 1-115 des P12
<b>px 12k 1-60</b>	px 12k 1/4	Aminosäuren 1-60 des P12
<b>px 12k 55-115</b>	px 12k 3/2	Aminosäuren 55-115 des P12

Fortsetzung Tab. 6: nächste Seite

Fortsetzung Tab. 6:

pPVX P2A Ascl mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
px 8k 1-70	px 8k 1/2	Aminosäuren 1-70 des P8
px 8k 1-42	px 8k 1/4	Aminosäuren 1-42 des P8
px 8k 37-70	px 8k 3/2	Aminosäuren 37-70 des P8

Jeweils 5 µg dieser Konstrukte wurden auf *Datura stramonium* abgerieben und die Symptombildung bis 21 Tagen nach Inokulation - in Ausnahmen auch bis 30 dpi - dokumentiert. Darüberhinaus wurde die Viruskonzentration nach 14 und 21 Tagen in inokulierten und systemisch infizierten Blättern mittels ELISA bestimmt.

#### a) Expression des ganzlängigen P25 und verschiedener Teilbereiche dieser Sequenz

Die Expression des ganzlängigen P25 und verschiedener Teilbereiche davon führten zur Ausprägung der in Tab. 7 dargestellten Symptombilder.

Tab. 7: Zusammenfassung der nach Inokulation mit pPVX P2A-Konstrukten + verschiedene Bereiche der P25-Gensequenz auftretenden Symptombilder auf *Datura stramonium*.  
Die Beurteilung ergab sich aus dem Gesamtbild der über 21 Tage dokumentierten Symptombesobachtungen. Die Symptomstärke wurde durch direkten Vergleich der Symptomausprägungen in den mit verschiedenen Konstrukten inokulierten Pflanzen bestimmt.  
Hierbei galt: 2 - mittel; 3 - stark; 4 - sehr stark.

pPVX P2A Ascl mit	Symptombildung					
	Stärke	Nekrosen		Chlorosen	Blattrollen	Blasenbildung
		inok.	system.			
px 25k 1-226	4	-	✓	✓	✓	✓
px 25k 1-173	2	-	-	✓	✓	-
px 25k 1-92	3	-	-	✓	✓	✓
px 25k 87-226	4	-	✓	✓	✓	✓
px 25k 87-173	3	-	-	✓	✓	✓
px 25k 123-226	4	-	✓	✓	✓	✓

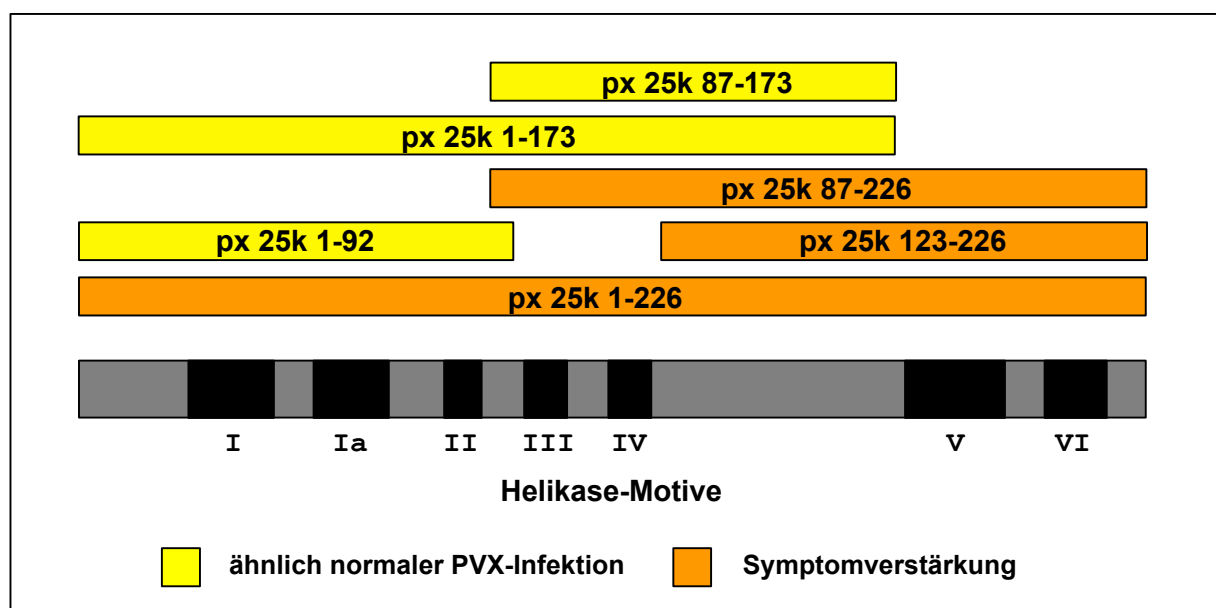


Abb. 21: Zusammenfassende Darstellung der verschiedenen über pPVX P2A Ascl in *Datura stramonium* exprimierten Bereiche des TGB-Proteins P25 aus PVX im Zusammenhang mit den dadurch verursachten Symptombildern.

Die durch Expression verschiedener Bereiche des P25 hervorgerufenen Symptombilder ließen sich im wesentlichen zwei verschiedenen Gruppen zuordnen (vgl. Abb. 21).

Die erste Gruppe umfasste die Teilbereiche, deren Expression zu einem mit einer normalen PVX-Infektion vergleichbaren Symptombild führte (vgl. Abb. 21: gelbe Balken). Dazu gehörten die Teilstücke px 25k 1-173, 1-92 und 87-173. Die ganzlängige P25-Sequenz sowie die Teilstücke px 25k 87-226 und 123-226 verursachten dagegen sehr heftige Symptome. Charakteristisch waren hier vor allem die starken Nekrosen auf den älteren systemisch infizierten Blättern, die bei den übrigen Konstrukten nicht zu beobachten waren. Darüberhinaus starben diese Pflanzen meist 3-4 Wochen nach Inokulation vollständig ab. Diese Konstrukte ließen sich zu einer zweiten Gruppe zusammenfassen (vgl. Abb. 21: orangefarbige Balken). Auffällig war, daß nur die P25-Varianten eine Symptomverstärkung hervorrufen, die den C-terminalen Bereich mit den darin enthaltenen Helikase-Motiven V und VI enthalten. Varianten, denen dieser Bereich fehlte, verursachten dagegen einen normalen Phänotyp.

Trotz der starken Unterschiede in der Symptomausprägung entsprachen die ELISA-Werte in allen infizierten Pflanzen den für eine PVX-Infektion üblichen Werten.

### b) Expression des ganzlängigen P12 und verschiedener Teilbereiche dieser Sequenz

Bei Expression der verschiedenen P12-Varianten konnten die in Tab. 8 dargestellten Symptombilder in den infizierten Pflanzen beobachtet werden.

Tab. 8: Zusammenfassung der nach Inokulation mit pPVX P2A-Konstrukten + verschiedene Bereiche der P12-Gensequenzen auftretenden Symptombilder auf *Datura stramonium*.

Die Beurteilung ergab sich aus dem Gesamtbild der über 21 Tage dokumentierten Symptombesobachtungen. Die Symptomstärke wurde durch direkten Vergleich der Symptomausprägungen in den mit verschiedenen Konstrukten inokulierten Pflanzen bestimmt.

Hierbei galt: (1) - sehr schwach, kaum sichtbar; 1 - schwach; 2 - mittel; () - nur in geringem Maße.

pPVX P2A Ascl mit	Symptombildung					
	Stärke	Nekrosen		Chlorosen	Blattrollen	Blasenbildung
		inok.	system.			
px 12k 1-115	(1)	-	-	(✓)	-	-
px 12k 1-60	2	-	✓	✓	-	-
px 12k 55-115	2	-	✓	✓	-	-

Im Gegensatz zu der symptomverstärkenden Wirkung einiger P25-Varianten war bei den Pflanzen, in denen verschiedene Bereiche des P12 zur Expression gebracht wurden, eine nur sehr milde Symptomatik zu beobachten, die sich auch in relativ geringen ELISA-Werten von etwa einem Viertel bis einem Zehntel der normalen Werte bemerkbar machte.

Besonders auffällig wirkte sich die Expression des ganzlängigen P12 auf die Symptombildung aus. Die infizierte Pflanze erschien über einen Zeitraum von ca. 16 Tagen symptomfrei. Auch Virus ließ sich in diesem Zeitraum weder in inokuliertem noch in systemisch infiziertem Blattmaterial nachweisen. Erst dann begannen sich leichte Symptome in Form von systemischen Chlorosen auszubilden, wobei in diesen Blättern schließlich auch sehr geringe Viruskonzentrationen nachweisbar waren (~1/10 des normalen ELISA-Wertes). Nach ca. 23 Tagen zeigten sich auf den jungen Blättern wiederum keinerlei Symptome mehr, und es konnte in diesen Blättern auch kein Virus mehr nachgewiesen werden.

Die Überexpression des ganzlängigen P12 schien damit eine deutliche Hemmung der Virusvermehrung herbeizuführen, die sich in sehr geringen Viruskonzentrationen und in einem ‚recovery‘-Effekt der infizierten Pflanze äußerte.

### c) Expression des ganzlängigen P8 und verschiedener Teilbereiche dieser Sequenz

Die durch Expression der verschiedenen pPVX px 8k-Konstrukte verursachten Symptombilder sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Zusammenfassung der nach Inokulation mit pPVX P2A-Konstrukten + verschiedene Bereiche der P8-Gensequenz auftretenden Symptombilder auf *Datura stramonium*.  
Die Beurteilung ergab sich aus dem Gesamtbild der über 21 Tage dokumentierten Symptombesobachtungen. Die Symptomstärke wurde durch direkten Vergleich der Symptomausprägungen in den mit verschiedenen Konstrukten inokulierten Pflanzen bestimmt.  
Hierbei galt: 1 - schwach; 2 - mittel; 3 - stark.

pPVX P2A Ascl mit	Symptombildung					
	Stärke	Nekrosen		Chlorosen	Blattrollen	Blasenbildung
		inok.	system.			
px 8k 1-70	3	-	-	✓	✓	✓
px 8k 1-42	1	✓	-	-	-	-
px 8k 37-70	2	-	-	✓	✓	✓

Die Expression des ganzlängigen P8 sowie des N-terminal verkürzten px 8k 37-70 äußerte sich in Symptomen, die im wesentlichen im Rahmen einer normalen PVX-Infektion lagen. Auch die Viruskonzentrationen in inokulierten und systemisch infizierten Blättern entsprachen den üblichen Werten.

Im Gegensatz dazu zeigte sich im Falle des C-terminal verkürzten px 8k 1-42 ein vollkommen neues Symptombild. In den mit dem entsprechenden Konstrukt infizierten Pflanzen traten lediglich auf den inokulierten Blättern wenige punktförmige Nekrosen auf, deren Anzahl vom ersten Erscheinen an konstant blieb. Über den gesamten Testzeitraum von 21 Tagen konnten keinerlei systemische Symptome beobachtet werden. Auch Virus konnte weder in systemisch infiziertem Blattmaterial noch in den Bereichen zwischen den Nekrosen auf den inokulierten Blättern nachgewiesen werden. Lediglich in den Nekrosen selbst wurden extrem geringe Virusmengen detektiert.

Die Expression dieses P8-Teilstücks führte folglich zu einem stark virushemmenden Effekt, der sich in einer starken Einschränkung der Virusausbreitung bemerkbar machte.

Da die Expression der P25-Sequenzen eher zu einer Förderung der Virusinfektion führte und die antivirale Wirkung des P12 nur auf das ganzlängige Protein beschränkt zu sein schien, wurden die Untersuchungen an diesen Sequenzen des *Triple gene blocks* nicht weitergeführt.

Dagegen stellte das C-terminal verkürzte P8-Teilstück mit seinen stark virushemmenden Eigenschaften eine ideale Grundlage für eine intensivere Untersuchung der antiviralen Wirkung dieses Sequenzbereiches dar. Daher wurden weitere auf diesem Teilstück basierende Konstrukte hergestellt.

### 2.1.3. Expression verschiedener Teilbereiche des *Triple gene block*-Proteins P8

Um den für die beobachtete Hemmwirkung des P8-Teilstückes px 8k 1-42 verantwortlichen Bereich weiter einschränken zu können, wurden folgende Konstrukte erstellt:

Tab. 10: Beschreibung der pPVX P2A-Konstrukte mit verschiedenen Teilbereichen des *Triple gene block*-Proteins P8 aus PVX

pPVX P2A Ascl mit	Primer-kombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
px 8k 1-46	px 8k 1/8	Aminosäuren 1-46 des P8
px 8k 1-43	px 8k 1/9	Aminosäuren 1-43 des P8
px 8k 1-41	px 8k 1/17	Aminosäuren 1-41 des P8
px 8k 1-40	px 8k 1/10	Aminosäuren 1-40 des P8
px 8k 1-39	px 8k 1/18	Aminosäuren 1-39 des P8
px 8k 1-38	px 8k 1/11	Aminosäuren 1-38 des P8
px 8k 1-36	px 8k 1/12	Aminosäuren 1-36 des P8
px 8k 1-34	px 8k 1/13	Aminosäuren 1-34 des P8
px 8k 1-31	px 8k 1/5	Aminosäuren 1-31 des P8
px 8k 7-46	px 8k 7/8	Aminosäuren 7-46 des P8
px 8k 7-43	px 8k 7/9	Aminosäuren 7-43 des P8
px 8k 7-42	px 8k 7/4	Aminosäuren 7-42 des P8
px 8k 7-41	px 8k 7/17	Aminosäuren 7-41 des P8
px 8k 7-40	px 8k 7/10	Aminosäuren 7-40 des P8
px 8k 7-39	px 8k 7/18	Aminosäuren 7-39 des P8
px 8k 7-38	px 8k 7/11	Aminosäuren 7-38 des P8
px 8k 7-36	px 8k 7/12	Aminosäuren 7-36 des P8
px 8k 7-34	px 8k 7/13	Aminosäuren 7-34 des P8
px 8k 7-31	px 8k 7/5	Aminosäuren 7-31 des P8
px 8k 32-70	px 8k 6/2	Aminosäuren 32-70 des P8

Jeweils 5 µg dieser Konstrukte wurden auf *Datura stramonium* abgerieben und die Symptombildung bis 21 Tagen nach Inokulation dokumentiert. Darüberhinaus wurde die Viruskonzentration nach 14 und 21 Tagen in inokulierten und systemisch infizierten Blättern mittels ELISA bestimmt.

Tab. 11: Zusammenfassung der nach Inokulation mit pPVX P2A-Konstrukten + verschiedene Bereiche der P8-Gensequenz auftretenden Symptombilder auf *Datura stramonium*.

Die Beurteilung ergab sich aus dem Gesamtbild der über 21 Tage dokumentierten Symptombesobachtungen. Die Symptomstärke wurde durch direkten Vergleich der Symptomausprägungen in den mit verschiedenen Konstrukten inokulierten Pflanzen bestimmt.

Hierbei galt: 1 - schwach; 2 - mittel; 3 - stark; 4 - sehr stark; () - nur in geringem Maße.

pPVX P2A Ascl mit	Symptombildung					
	Stärke	Nekrosen		Chlorosen	Blatt- rollen	Blasen- bildung
		inok.	system.			
px 8k 1-70	3	-	-	✓	✓	✓
px 8k 1-46	2	-	-	✓	✓	✓
px 8k 1-43	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 1-42	1	✓	-	-	-	-
px 8k 1-41	1	✓	(✓)	-	-	-
px 8k 1-40	1	✓	(✓)	-	-	-
px 8k 1-39	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 1-38	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 1-36	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 1-34	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 1-31	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 7-46	1-2	✓	(✓)	-	-	-
px 8k 7-43	1-2	✓	(✓)	-	-	-
px 8k 7-42	1	✓	(✓)	-	-	-
px 8k 7-41	1	✓	(✓)	-	-	-
px 8k 7-40	1	✓	(✓)	-	-	-
px 8k 7-39	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 7-38	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 7-36	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 7-34	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 7-31	4	✓	✓	✓	✓	✓
px 8k 32-70	2	-	-	✓	✓	-
px 8k 37-70	2	-	-	✓	✓	✓

Die Expression der verschiedenen P8-Teilstücke äußerte sich in den infizierten Pflanzen in sehr unterschiedlichen Symptombildern (vgl. Tab. 11), die sich im wesentlichen aber drei unterschiedlichen Gruppen zuordnen ließen (vgl. Abb. 22).

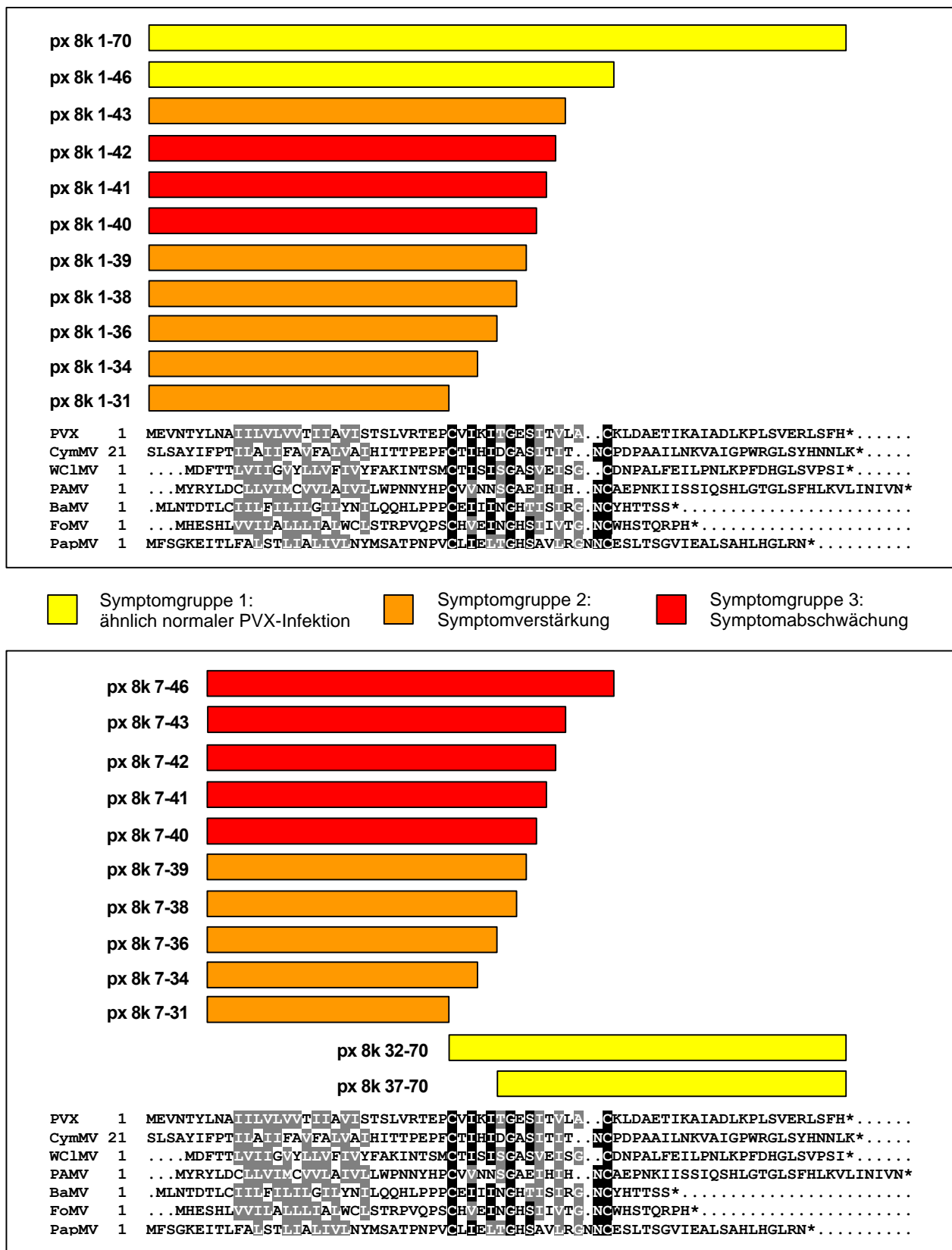


Abb. 22: Schematische Darstellung der verschiedenen über pPVX P2A Ascl in *Datura stramonium* exprimierten Bereiche des P8 aus PVX im Zusammenhang mit dem dadurch verursachten Symptombild.

Das Alignment im unteren Bereich der Schemata zeigt einen Sequenzvergleich der TGBp3-Proteine verschiedener Potexvirien. Die darüberliegenden Balken geben jeweils den Bereich des PVX P8 an, der durch die einzelnen P8-Teilstücke umfasst wird. Die Art des durch Expression der P8-Sequenzen hervorgerufenen Symptombildes wird durch die verschiedenfarbigen Füllbereiche der Balken angezeigt.

Die erste Gruppe bildeten die Konstrukte, die in den infizierten Pflanzen einen mit dem einer normalen PVX-Infektion vergleichbaren Phänotyp verursachten (vgl. Abb. 23 A). Die zu dieser Gruppe gehörigen Sequenzen sind in Abb. 22 als gelbe Balken dargestellt. Die Konstrukte der zweiten Gruppe riefen in den Pflanzen eine extreme Symptomverstärkung hervor, gekennzeichnet durch heftige punktförmige Nekrosen auf inokulierten und systemisch infizierten Blättern, Chlorosen, starkem Blattrollen, Blasenbildung und baldigem Absterben der Pflanzen (vgl. Abb. 23 B). Die zu dieser Gruppe gehörigen Konstrukte erscheinen in Abb. 22 als orangefarbige Balken. Trotz der sehr starken Symptomausprägung lagen die mit Hilfe des ELISA ermittelten Viruskonzentrationen in diesen Pflanzen im Bereich einer normalen PVX-Infektion. Die verstärkte Symptombildung ging folglich nicht mit einer erhöhten Viruskonzentration einher. In der dritten Gruppe wurden schließlich die Konstrukte zusammengefasst, die - wie bereits px 8k 1-42 - zu einer starken Hemmung der PVX-Ausbreitung in den infizierten Pflanzen führten (Abb. 22, rote Balken). Auch hier äußerte sich der antivirale Effekt in nur wenigen punktförmigen Nekrosen auf den inokulierten Blättern (vgl. Abb. 23 C). In einigen dieser Pflanzen traten diese Nekrosen nach einiger Zeit allerdings auch systemisch auf, wobei es sich aber lediglich um sehr wenige (insgesamt ca. 5-15) zu einem späten Zeitpunkt der Infektion handelte. Wie schon für px 8k 1-42 beobachtet, konnte auch in diesen Pflanzen PVX nur in den wenigen Nekrosen auf den inokulierten sowie - wenn vorhanden - auf den systemisch infizierten Blättern in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. In den Bereichen zwischen den Nekrosen konnte kein Virus detektiert werden.



Abb. 23A: Erläuterung siehe nächste Seite



Fortsetzung Abb. 23:



Abb. 23: Fotografische Darstellung der in den mit verschiedenen pPVX P2A px 8k-Konstrukten infizierten *Datura stramonium*-Pflanzen auftretenden Symptombilder.

**A:** Pflanze mit Phänotyp der Symptomgruppe 1 (Chlorosen, Blattrollen und leichte Blasenbildung; vergleichbar mit normaler PVX-Infektion); **B:** Pflanze mit Phänotyp der Symptomgruppe 2 (heftige, punktförmige Nekrosen auf inokulierten und systemisch infizierten Blättern, Chlorosen, starkes Blattrollen, Blasenbildung und baldiges Absterben der Pflanze); **C:** Pflanze mit Phänotyp der Symptomgruppe 3 (wenige, punktförmige Nekrosen auf inokuliertem Blatt)

Die Untersuchung der verschiedenen Teilsequenzen im Hinblick auf die durch ihre Expression verursachte Beeinflussung der Virusausbreitung offenbarte, daß die Sequenzen mit virushemmender Wirkung auf einen sehr kleinen Bereich innerhalb der stark konservierten Region im mittleren Teil des P8 beschränkt waren. Die effektivste Hemmung wurde durch Expression des Teilstückes px 8k 1-42 erreicht. Hier blieb die Infektion ausschließlich auf die punktförmigen Nekrosen auf dem inokulierten Blatt limitiert.

Bereits eine Verkürzung bzw. Verlängerung dieser Sequenzen um 3 bzw. 1 Aminosäure führte zu einem Umschlag der Symptomausprägung ins vollkommene Gegenteil. Anstelle eines Hemmeffekts war in diesen Pflanzen eine extrem starke Symptombildung mit auffallend heftigen nekrotischen Reaktionen zu beobachten (vgl. px 8k 1-43, 1-39). Eine zusätzliche Verkürzung der antiviralen Sequenzen um sechs N-terminale Aminosäuren bewirkte zum einen eine leichte Abschwächung des Hemmeffektes - alle Pflanzen, in denen Teilstücke mit hemmender Wirkung exprimiert wurden, zeigten nach einiger Zeit auch systemisch einige wenige Nekrosen (vgl. Tab. 11) -, zum anderen aber gleichzeitig eine Ausweitung des Bereichs, der für den Hemmeffekt verantwortlich zu sein schien.

Die Expression von Teilstücken, die den N-Terminus mit der gesamten konservierten Region bzw. Bereiche der konservierten Region plus den C-Terminus umfassten (vgl. px 8k 1-46 bzw. px 8k 32-70 und 37-70) hatte keinen offensichtlichen Einfluß auf Virusausbreitung und Symptombildung. Folglich schien für die Auslösung des Hemmeffektes nicht nur ein bestimmter Bereich der konservierten Region im mittleren Teil des P8 essentiell zu sein, sondern auch die stark hydrophobe Region im N-terminalen Bereich.

Nachdem die für die antivirale Wirkung verantwortlichen Sequenzbereiche des P8 identifiziert werden konnten, stellte sich nun die Frage nach dem Mechanismus des Hemmeffekts. Warum und auf welche Weise verhindert die Expression dieser Teilstücke eine normale Ausbreitung des PVX in den infizierten Pflanzen? Besitzen diese Sequenzen schon von sich aus eine nekrotisierende Wirkung auf die Zellen, in denen sie exprimiert werden, oder tritt dieses Phänomen nur im Zusammenhang mit dem Virus auf? Entwickelt sich der antivirale Effekt nur, wenn diese Sequenzen direkt über PVX exprimiert werden, oder kann diese Reaktion auch durch *in trans* exprimiertes Protein ausgelöst werden, wie es in einem transgenen System der Fall wäre? Sind auch die TGBp3-Sequenzen anderer Potexviren dazu in der Lage, sich auf ähnliche Art und Weise auf die PVX-Ausbreitung auszuwirken?

Um diese Fragestellungen zu klären, wurden weitere Versuche durchgeführt, die im folgenden dargestellt werden.

#### **2.1.4. Untersuchung der Beeinflussung des Zell-zu-Zell-Transports des PVX durch transiente Expression verschieden verkürzter Teilstücke des *Triple gene block*-Proteins P8**

Obwohl sich gerade in den letzten Jahren zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Rolle der *Triple gene block* kodierten Transportproteine verschiedener Viren im Hinblick auf den Zell-zu-Zell-Transport beschäftigt haben (Erhardt et al., 1999a und b; Lauber et al., 1998; Lough et al., 2000; Morozov et al., 1999b; Solovyev et al., 1999; Solovyev et al., 2000; Yang et al., 2000), bleibt die genaue Funktion des TGBp3 bisher weitgehend unklar. Umfangreiche Versuche zur Funktion des TGBp3 des PSLV (*Poa semi-latent virus*) sowie des PVX wurden von Solovyev et al. (2000) durchgeführt (vgl. A 3.3.2.).

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß das TGBp3 dazu in der Lage ist, die subzelluläre Lokalisation des TGBp2 maßgeblich zu beeinflussen, indem es den intrazellulären Transport des membrangebundenen TGBp2 zur Zellperipherie vermittelt. Eine Störung dieser Funktion des nativen P8 könnte möglicherweise eine Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Phänomene sein, die bei Expression einiger der Teilstücke in den infizierten Pflanzen auftraten. Daher wurde - basierend auf den von Solovyev et al. (2000) durchgeführten Versuchen - ein ähnliches Konzept entworfen, in dem die Fähigkeit ausgewählter P8-Teilstücke, den intrazellulären Transport des TGBp2 aus PVX und aus PSLV zu vermitteln, untersucht werden sollte.

Folgende, auf pRT 103 basierende Konstrukte wurden von S. Morozov und A. Solovyev freundlicherweise für diese Versuche zu Verfügung gestellt:

Tab. 12: Beschreibung der auf pRT 103 basierenden Konstrukte mit integrierten Gensequenzen der *Triple gene block*-Proteine TGBp2 und TGBp3 aus PSLV und PVX

pRT 103 mit	Beschreibung
GFP-PSLV TGBp2	ermöglicht transiente Expression des GFP-markierten TGBp2 aus PSLV
dsRed-PSLV TGBp3	ermöglicht transiente Expression des dsRed-markierten TGBp3 aus PSLV
GFP-PVX TGBp2	ermöglicht transiente Expression des GFP-markierten TGBp2 aus PVX
PVX-TGBp3	ermöglicht transiente Expression des TGBp3 aus PVX

Für die Untersuchung der Fähigkeit, den intrazellulären Transport des TGBp2-Proteins zu vermitteln, wurden einige der verkürzten P8-Teilstücke ausgewählt. Die Wahl dieser Teilstücke richtete sich nach dem von ihnen erzeugten Effekt auf Symptombildung und Virusausbreitung in den durch die entsprechenden pPVX P2A-Konstrukten infizierten Pflanzen. Aus jeder der drei Symptomgruppen wurden ein oder mehrere Vertreter herausgesucht. Für die Gruppe 1 mit keinem offensichtlichen Effekt auf die Symptomausprägung stand das Teilstück px 8k 1-46, während die durch eine extreme Symptomverstärkung gekennzeichnete zweite Gruppe durch das Teilstück px 8k 1-39 repräsentiert wurde. Aus der besonders interessanten Gruppe 3 mit deutlicher Symptomabschwächung und starker Einschränkung der Virusausbreitung wurden drei Teilstücke ausgewählt (px 8k 1-40, 1-41 und 1-42).

Sämtliche Sequenzen wurden mit C-terminal anhängendem P2A verwendet, um einen direkten Vergleich mit den über pPVX P2A exprimierten P8-Teilstücken zu ermöglichen. Um darüberhinaus eine eventuelle Beeinflussung der beobachteten Phänomene durch das P2A-Oligopeptid aufdecken zu können, wurde das Teilstück px 8k 1-42 auch ohne diese Sequenz eingesetzt.

Die verschiedenen Sequenzen wurden in pRT 103 eingebracht, wobei die Amplifikation unter Verwendung der in Tab. 13 angegebenen Matrizen-DNAs und Primerkombinationen erfolgte.

Tab. 13: Beschreibung der auf pRT 103 basierenden Konstrukte mit integrierten Gensequenzen verschieden verkürzter P8-Teilstücke

pRT 103 mit	Matrizen-DNA	Primerkombination	Beschreibung
px 8k 1-46P2A	pPVX P2A px 8k 1-46	px 8k 15/P2A 1	ermöglicht Expression der AS 1-46 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus
px 8k 1-42P2A	pPVX P2A px 8k 1-42	px 8k 15/P2A 1	ermöglicht Expression der AS 1-42 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus
px 8k 1-42	pPVX P2A px 8k 1-42	px 8k 15/px 8k 16	ermöglicht Expression der AS 1-42 des P8 ohne P2A-Sequenz am C-Terminus
px 8k 1-41P2A	pPVX P2A px 8k 1-41	px 8k 15/P2A 1	ermöglicht Expression der AS 1-41 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus
px 8k 1-40P2A	pPVX P2A px 8k 1-40	px 8k 15/P2A 1	ermöglicht Expression der AS 1-40 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus
px 8k 1-39P2A	pPVX P2A px 8k 1-39	px 8k 15/P2A 1	ermöglicht Expression der AS 1-39 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus

Desweiteren wurden folgende, der in Tab. 10 (C 2.1.3.) bereits beschriebenen pPVX P2A px 8k-Konstrukte verwendet:

pPVX P2A px 8k 1-46  
pPVX P2A px 8k 1-42  
pPVX P2A px 8k 1-41

pPVX P2A px 8k 1-40  
pPVX P2A px 8k 1-39

Die oben genannten Konstrukte wurden nun in verschiedenen Kombinationen durch Partikelbeschuß in *Nicotiana benthamiana*-Zellen eingebracht und die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten TGBp2- bzw. TGBp3-Proteine unter dem Mikroskop zwei Tage nach Beschuß untersucht.

#### a) Untersuchung der Beeinflussung der Lokalisierung der TGBp2-Proteine aus PSLV und PVX durch verschieden verkürzte Teilstücke des P8-Proteins aus PVX

In diesem Versuchsteil wurde das GFP-markierte TGBp2 aus PSLV bzw. aus PVX zusammen mit den verschiedenen P8-Teilstücken in *Nicotiana benthamiana*-Zellen exprimiert. Als Kontrollen dienten die alleinige Expression der Fusionsproteine GFP-PSLV TGBp2, ds-Red-PSLV TGBp3 und GFP-PVX TGBp2 sowie die gemeinsame Expression GFP-PSLV TGBp2/ds-Red-TGBp3, GFP-PSLV TGBp2/PVX TGBp3, GFP-PVX TGBp2/dsRed-PSLV TGBp3 und GFP-PVX TGBp2/ PVX TGBp3.

Für die Kontrollen konnten die in Tab. 14a und b dargestellten Beobachtungen gemacht werden.

Tab. 14a: Beschreibung der in den verschiedenen Kontrollen auftretenden Lokalisation der Fluoreszenz der markierten TGBp2- bzw. TGBp3-Proteine aus PSLV

Kontrollen	Lokalisation der Fluoreszenz
GFP-PSLV TGBp2	an Elementen des Endomembransystems
dsRed-PSLV TGBp3	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PSLV TGBp2/dsRed-PSLV TGBp3	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie; Colokalisation der dsRed- und der GFP-Fluoreszenz
GFP-PSLV TGBp2/PVX TGBp3	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie

Tab. 14b: Beschreibung der in den verschiedenen Kontrollen auftretenden Lokalisation der Fluoreszenz der markierten TGBp2- bzw. TGBp3-Proteine aus PVX

Kontrollen	Lokalisation der Fluoreszenz
GFP-PVX TGBp2	an Elementen des Endomembransystems
GFP-PVX TGBp2/PVX TGBp3	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PVX TGBp2/dsRed-PSLV TGBp3	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie

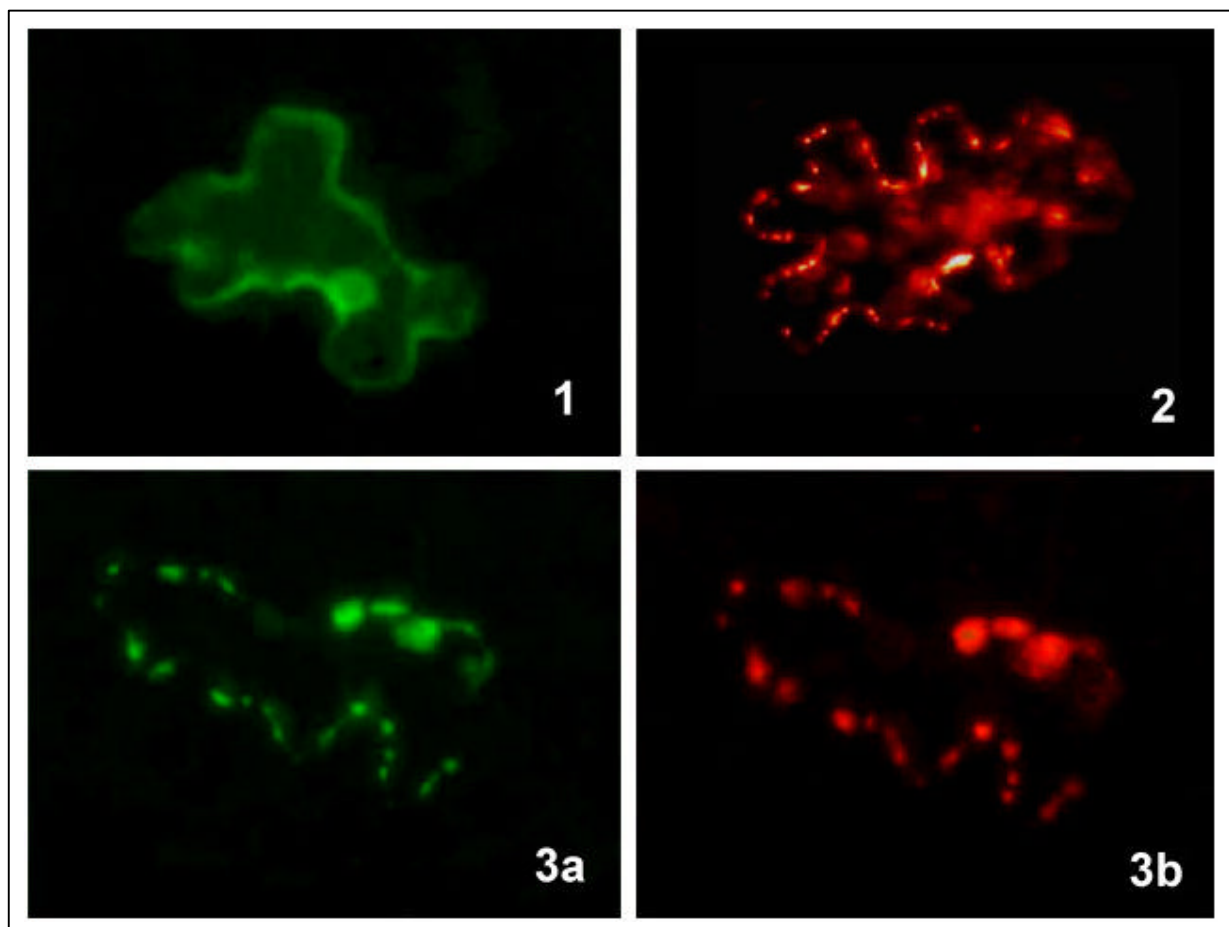


Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *N. benthamiana*-Epidermiszellen. Transiente Expression fluoreszenzmarkierter TGB-Proteine nach Partikelbeschuss.  
**1:** Endomembran-assoziierte Lokalisation des GFP-markierten TGBp2-Proteins;  
**2:** Periphere Lokalisation des dsRed-markierten TGBp3-Proteins;  
**3a + 3b:** Colokalisation des GFP-TGBp2 (3a) und des dsRed-TGBp3 (3b) an der Zellperipherie bei gleichzeitiger Expression dieser Proteine in einer Zelle

Die in den Kontrollen beobachtete Lokalisation der verschiedenen einzeln exprimierten TGB-Proteine des PSLV und des PVX stimmten weitgehend mit den Erwartungen überein. Im Fall der TGBp2-Proteine war die GFP-Fluoreszenz mehr oder minder gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt mit starker Konzentration im Zellkern (vgl. Abb. 24.1). Dies weist auf die von Solovyev et al. (2000) beschriebene Assoziation des TGBp2 an die Elemente des Endomembransystems, welches durch das corticale Endoplasmatische Reticulum, den Zellkern und den Golgi-Apparat gebildet wird, hin. Das mit dem rot fluoreszierenden dsRed markierte PSLV TGBp3 beschränkte sich dagegen auf unregelmäßig geformte Aggregate entlang der Zellwand, welche mit Membranstrukturen nahe der Plasmamembran assoziiert waren. Weder im Zellinneren noch im Bereich des Zellkerns war eine Fluoreszenz zu beobachten (vgl. Abb. 24.2). Dieser Phänotyp zeigte sich auch bei der Kombination des TGBp2 mit TGBp3. Das GFP-markierte TGBp2 befand sich hier ebenfalls in peripheren Aggregaten entlang der Zellwand und war nicht mehr mit Strukturen des Endomembransystems verbunden (vgl. Abb. 24.3a). Ein Vergleich der Lokalisation der mit unterschiedlichen Markerproteinen versehenen TGB-Proteine zeigte eine deutliche Colokalisation des grün fluoreszierenden GFP-PSLV TGBp2-Fusionsproteins und des rot fluoreszierenden dsRed-PSLV TGBp3-Fusionsproteins (vgl. Abb. 24.3a und 3b). TGBp3 scheint damit tatsächlich mit dem TGBp2 zu interagieren und dieses in bestimmte Bereiche der Zelle zu transportieren. Darüberhinaus spielte es hierbei offensichtlich keine Rolle, ob der intrazelluläre Transport durch das homologe oder das heterologe TGBp3 vermittelt wurde. In beiden Fällen zeigte sich das gleiche Bild einer gemeinsamen, peripheren Lokalisation.

Die für die Kontrollen ermittelten Beobachtungen konnten nun mit denen für die verschiedenen Kombinationen aus TGBp2 und den unterschiedlichen P8-Teilstücken verglichen werden.

Tab. 15a: Beschreibung der zu beobachtenden Lokalisation der GFP-Fluoreszenz bei Kombination des GFP-markierten PSLV-TGBp2 mit verschiedenen verkürzten P8-Teilstücken

<b>Konstruktkombination</b>	<b>Lokalisation des GFP-markierten TGBp2</b>
GFP-PSLV TGBp2 + px 8k 1-46 P2A	in Form von unregelmäßigen Aggregationen an der Zellperipherie sowie teilweise auch im Zellinneren; deutliche Kernfluoreszenz
GFP-PSLV TGBp2 + px 8k 1-42 P2A	an Elementen des Endomembransystems
GFP-PSLV TGBp2 + px 8k 1-42	an Elementen des Endomembransystems
GFP-PSLV TGBp2 + px 8k 1-41 P2A	in Form von unregelmäßigen Aggregationen an der Zellperipherie sowie teilweise auch im Zellinneren; deutliche Kernfluoreszenz
GFP-PSLV TGBp2 + px 8k 1-40 P2A	in Form von unregelmäßigen Aggregationen an der Zellperipherie sowie teilweise auch im Zellinneren; deutliche Kernfluoreszenz
GFP-PSLV TGBp2 + px 8k 1-39 P2A	in Form von unregelmäßigen Aggregationen an der Zellperipherie sowie teilweise auch im Zellinneren; deutliche Kernfluoreszenz

Tab. 15b: Beschreibung der zu beobachtenden Lokalisation der GFP-Fluoreszenz bei Kombination des GFP-markierten PVX-TGBp2 mit verschiedenen verkürzten P8-Teilstücken

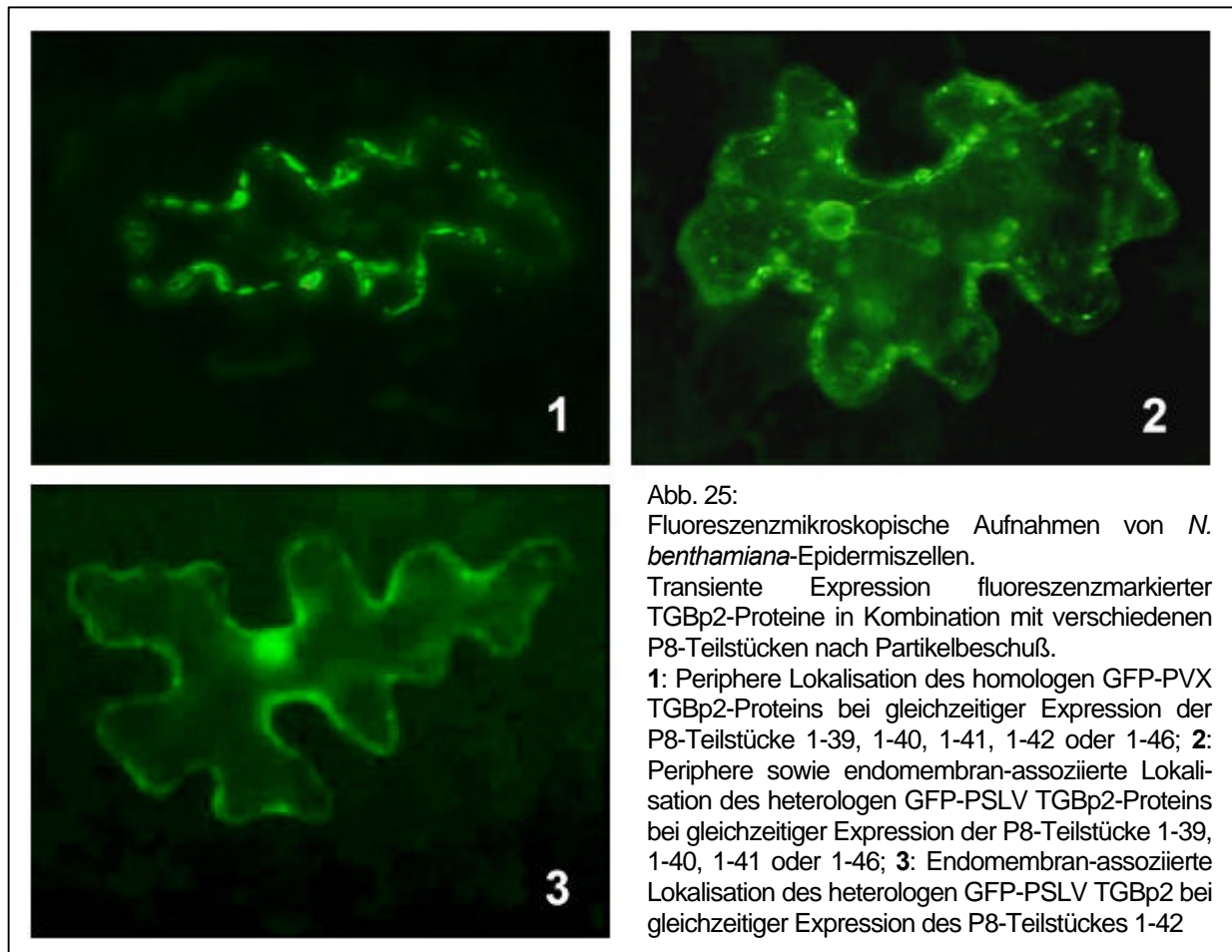
Konstruktkombination	Lokalisation des GFP-markierten TGBp2
GFP-PVX TGBp2 + px 8k 1-46 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + px 8k 1-42 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + px 8k 1-42	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + px 8k 1-41 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + px 8k 1-40 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + px 8k 1-39 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie

Bei Kombination der GFP-markierten TGBp2-Proteine des PSLV und des PVX mit verschiedenen verkürzten Teilstücken des PVX TGBp3 konnten interessante Beobachtungen gemacht werden (vgl. Tab. 15a und b).

Überraschenderweise zeigte sich in Kombination mit dem homologen PVX-TGBp2 ein gänzlich anderes Bild als in Kombination mit dem heterologen PSLV TGBp2. Während im Fall des homologen Systems alle P8-Teilstücke dazu in der Lage waren, einen vollständigen Transport des GFP-PVX TGBp2 zu vermitteln (vgl. Abb. 25.1), konnte bei Verwendung des heterologen PSLV TGBp2 höchstens ein unvollständiger Transport beobachtet werden. Neben der für einen erfolgreichen TGBp3-vermittelten Transport charakteristischen peripheren Lokalisation konnte hier das GFP-markierte PSLV TGBp2 sowohl im Bereich des Zellkerns als auch in Aggregationen im Zellinneren detektiert werden (vgl. Abb. 25.2). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß das entsprechende P8-Teilstück nur noch in eingeschränktem Maße in der Lage war, seine Transportfunktion zu erfüllen.

Besonders interessant waren darüberhinaus die bei der Kombination des PSLV-TGBp2 mit dem P8-Teilstück px 8k 1-42 gewonnenen Ergebnisse. Weder mit noch ohne anhängender P2A-Sequenz schien dieses Teilstück dazu befähigt zu sein, einen Transport des PSLV TGBp2 zu vermitteln. Die Lokalisation des PSLV TGBp2 entsprach in beiden Fällen seiner typischen, endomembran-gebundenen Lokalisation, wie sie auch in Abwesenheit des TGBp3 zu beobachten war (vgl. Abb. 25.3). Da bei Verwendung der wesentlich kürzeren P8-Sequenzen 1-41, 1-40 und 1-39 wiederum ein teilweiser Transport zu beobachten war, kann dieses Phänomen nicht auf einen generellen Funktionsverlust aufgrund einer zu starken Verkürzung zurückzuführen sein, sondern muß in direktem Zusammenhang mit diesem spezifischen Teilstück stehen, das - wie die Ergebnisse in C 2.1.3. zeigten - auch in pPVX P2A-infizierten Pflanzen den stärksten Hemmeffekt erzeugte.





**b) Untersuchung der Beeinflussung des Zusammenspiels der ganzlängigen TGBp2- und TGBp3-Proteine aus PSLV und PVX durch zusätzlich exprimierte, verkürzte Teilstücke des P8-Proteins aus PVX**

Eine weitere Möglichkeit, wie die verkürzten P8-Teilstücke auf intrazellulärer Ebene die Virusausbreitung beeinflussen könnten, liegt in der Störung der Interaktion zwischen TGBp2 und TGBp3. Um diesen Aspekt untersuchen zu können, wurden in diesem Versuchsteil die verschiedenen P8-Teilstücke in Kombination mit den zwei ganzlängigen TGB-Proteinen des PSLV bzw. des PVX exprimiert.

Tab. 16a: Beschreibung der zu beobachtenden Lokalisation der GFP-Fluoreszenz bei Kombination der verschieden verkürzten P8-Teilstücken mit den TGB-Proteinen 2 und 3 des PSLV

Konstruktkombination	Lokalisation des GFP-markierten TGBp2
GFP-PSLV TGBp2 + dsRed-PSLV TGBp3 + px 8k 1-46 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PSLV TGBp2 + dsRed-PSLV TGBp3 + px 8k 1-42 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PSLV TGBp2 + dsRed-PSLV TGBp3 + px 8k 1-41 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PSLV TGBp2 + dsRed-PSLV TGBp3 + px 8k 1-40 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PSLV TGBp2 + dsRed-PSLV TGBp3 + px 8k 1-39 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie



Tab. 16b: Beschreibung der zu beobachtenden Lokalisation der GFP-Fluoreszenz bei Kombination der verschiedenen verkürzten P8-Teilstücken mit den TGB-Proteinen 2 und 3 des PVX

Konstruktkombination	Lokalisation des GFP-markierten TGBp2
GFP-PVX TGBp2 + px TGBp3 + px 8k 1-46 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + px TGBp3 + px 8k 1-42 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + px TGBp3 + px 8k 1-41 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + px TGBp3 + px 8k 1-40 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + px TGBp3 + px 8k 1-39 P2A	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie

Die in Tab. 16a und b dargestellten Ergebnisse zeigen, daß in allen Fällen das GFP-markierte TGBp2 in Aggregaten an der Zellperipherie vorlag, was auf einen vollständigen, durch TGBp3 vermittelten Transport hinweist. Die verkürzten P8-Teilstücke schienen damit weder im homologen noch im heterologen System einen Einfluß auf die Interaktion zwischen TGBp2 und TGBp3 auszuüben.

### c) Untersuchung der Beeinflussung der Lokalisation der TGB-Proteine aus PSLV und PVX durch verschieden verkürzte, über pPVX P2A exprimierte Teilstücke des P8-Proteins aus PVX

Um die Bedingungen dieser Versuchsreihe stärker den Verhältnissen anzupassen, die in den mit verschiedenen pPVX P2A px 8k-Konstrukten infizierten Pflanzen vorlagen, wurden in diesem Versuchsteil die fluoreszenzmarkierten TGB-Proteine aus PSLV und PVX mit den pPVX P2A-Vollängenklonen kombiniert, die die PVX TGBp3-Teilstücke px 8k 1-46, 1-42, 1-40 und 1-41 tragen.

Tab. 17a: Beschreibung der zu beobachtenden Lokalisation der GFP-Fluoreszenz bei Kombination der pPVX P2A-Konstrukte + verschieden verkürzte P8-Teilstücke mit dem TGBp2 des PSLV

Konstruktkombination	Lokalisation der Fluoreszenz
GFP-PSLV TGBp2 + pPVX P2A px 8k 1-46	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PSLV TGBp2 + pPVX P2A px 8k 1-42	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PSLV TGBp2 + pPVX P2A px 8k 1-41	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PSLV TGBp2 + pPVX P2A px 8k 1-40	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PSLV TGBp2 + pPVX P2A px 8k 1-39	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie

Tab. 17b: Beschreibung der zu beobachtenden Lokalisation der GFP-Fluoreszenz bei Kombination der pPVX P2A-Konstrukte + verschieden verkürzte P8-Teilstücke mit dem TGBp2 des PVX

Konstruktkombination	Lokalisation der Fluoreszenz
GFP-PVX TGBp2 + pPVX P2A px 8k 1-46	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + pPVX P2A px 8k 1-42	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + pPVX P2A px 8k 1-41	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 + pPVX P2A px 8k 1-40	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
GFP-PXV TGBp2 +pPVX P2A px 8k 1-39	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie

Tab. 17c: Beschreibung der zu beobachtenden Lokalisation der GFP-Fluoreszenz bei Kombination der pPVX P2A-Konstrukte + verschieden verkürzte P8-Teilstücke mit dem TGBp3 des PSLV

Konstruktkombination	Lokalisation der Fluoreszenz
dsRed-PSLV TGBp3 + pPVX P2A px 8k 1-46	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
dsRed-PSLV TGBp3 + pPVX P2A px 8k 1-42	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
dsRed-PSLV TGBp3 + pPVX P2A px 8k 1-41	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
dsRed-PSLV TGBp3 + pPVX P2A px 8k 1-40	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie
dsRed-PSLV TGBp3 +pPVX P2A px 8k 1-39	in Form von Zellwand-assoziierten Einschlüssen und kleinen Aggregationen an der Zellperipherie

Wie die Ergebnisse in Tab. 17a-c zeigen, konnte in allen Fällen eine Fluoreszenz nur im Bereich der Zellperipherie nachgewiesen werden. Damit hatten die über pPVX P2A exprimierten P8-Teilstücke weder einen Effekt auf die TGBp3-vermittelte Lokalisation der TGBp2-Proteine beider Viren noch auf die Lokalisation des PSLV TGBp3.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Ursache für den Hemmeffekt, der durch die Expression bestimmter P8-Teilstücke in pPVX P2A-infizierten Pflanzen hervorgerufen wurde, offensichtlich nicht in einer Störung der Transportfunktion des nativen PVX TGBp3 bestehen kann, da im homologen System keinerlei direkte oder indirekte Beeinflussung der TGBp3-Funktion beobachtet werden konnte. Der Einfluß der P8-Teilstücke auf die Virusausbreitung muß sich damit auf anderer Ebene als der hier untersuchten abspielen.

#### 2.1.5. Untersuchung einer möglichen Autotoxizität verschiedener Teilstücke des P8-Proteins aus PVX

Ein Großteil der durch Expression verschiedener P8-Teilstücke hervorgerufenen Symptombilder war durch die Entwicklung mehr oder weniger starker Nekrosen geprägt. Dieses Symptombild trat bei einer normalen PVX-Infektion, wie sie durch das Kontrollkonstrukt ohne integrierte Fremdsequenz, pPVX P2A ATG, verursacht wird, in diesem Maße nicht auf. Damit ist es wahrscheinlich, daß diese Veränderungen des Phänotyps unmittelbar auf die exprimierten Fremdproteine zurückzuführen sind.

Dies wirft die Frage auf, ob sich die nekrotisierende Wirkung allein im Zusammenhang mit dem PVX entfaltet oder ob die P8-Sequenzen bereits von sich aus ein Absterben der exprimierenden Pflanzenzellen herbeiführen können. Dieser Aspekt spielt vor allem in Hinblick auf die geplante Herstellung transgener Pflanzen unter Verwendung der P8-Teilstücke mit virushemmender Wirkung eine entscheidende Rolle.

Zur Klärung dieser Frage war es notwendig, die infrage kommenden P8-Sequenzen allein - ohne die Anwesenheit des PVX - in einer Pflanze zu exprimieren. Eine schnelle und einfache Methode, eine dem transgenen Status ähnliche Expressionssituation zu schaffen, war die Agroinfektion. Hierzu wurden die gewünschten Sequenzen unter Kontrolle des 35S-Promotors aus CaMV in einen geeigneten Agrobakterien-Expressionsvektor eingebracht und diese Konstrukte in Agrobakterien transformiert. Kleine Mengen einer angezogenen Flüssigkultur wurden dann mit Hilfe einer Einwegspritze in die Internodien der Pflanze injiziert. Über das Leitgewebe der Pflanze sollten die Agrobakterien sich dann in der gesamten Pflanze ausbreiten und in den transfizierten Zellen für eine Expression der eingebrachten Fremdsequenz sorgen.

Auf diese Weise ließe sich eine mögliche autotoxische Wirkung der P8-Sequenzen leicht und schnell überprüfen.

Für den Agroinfektionsversuch wurden die gleichen P8-Teilstücke verwendet wie bereits für die Untersuchung der Beeinflussung des Zell-zu-Zell-Transports des PVX durch Expression bestimmter P8-Sequenzen (vgl. C 2.1.4.). Als Ausgangsvektoren für die Klonierung wurden die ebenfalls unter C 2.1.4. beschriebenen pRT 103 px 8k-Konstrukte verwendet. Die aus 35S-Promotor, Fremdsequenz und Polyadenylierungssignal bestehende Expressionskassette wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII aus diesen Konstrukte herausgeschnitten und in den Agrobakterien-Expressionsvektor pLH 9000 umklont. Die in Tab. 18 beschriebenen pLH-Konstrukte wurden in den Agrobakterienstamm GV3101 transformiert und eine aus einer Einzelkolonie angezogene Flüssigkultur zur Agroinfektion von jeweils drei *Nicotiana benthamiana*- bzw. *Datura stramonium*-Pflanzen genutzt.

Tab. 18: Beschreibung der auf pLH 9000 basierenden Konstrukte mit integrierten Gensequenzen verschieden verkürzter P8-Teilstücke zur Agroinfektion von *N. benthamiana* und *Datura stramonium*

pLH 9000 mit	Ausgangskonstrukt	Beschreibung
px 8k 1-46P2A	pRT 103 px 8k 1-46P2A	ermöglicht die Expression der AS 1-46 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus in agroinfizierten Pflanzen
px 8k 1-42P2A	pRT 103 px 8k 1-42P2A	ermöglicht die Expression der AS 1-42 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus in agroinfizierten Pflanzen
px 8k 1-41P2A	pRT 103 px 8k 1-41P2A	ermöglicht die Expression der AS 1-41 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus in agroinfizierten Pflanzen
px 8k 1-40P2A	pRT 103 px 8k 1-40P2A	ermöglicht die Expression der AS 1-40 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus in agroinfizierten Pflanzen
px 8k 1-39P2A	pRT 103 px 8k 1-39P2A	ermöglicht die Expression der AS 1-39 des P8 mit P2A-Sequenz am C-Terminus in agroinfizierten Pflanzen

Die agroinfizierten Pflanzen wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen im Hinblick auf eventuelle Ausbildung von nekrotischen Symptomen beobachtet. 14 Tage nach Infektion wurde an jeweils drei verschiedenen Stellen Blattmaterial abgenommen, eine DNA-Extraktion nach Tinker et al. (1993) durchgeführt und die erfolgreiche Ausbreitung der Agroinfektion in den Pflanzen mittels PCR nachgewiesen.

In allen Pflanzen konnten mit Hilfe für die Expressionkassette spezifischer Primer die gewünschten Fremdsequenzen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 26), so daß davon ausgegangen werden konnte, daß eine Expression dieser Sequenzen in weiten Bereichen der Pflanzen möglich war.

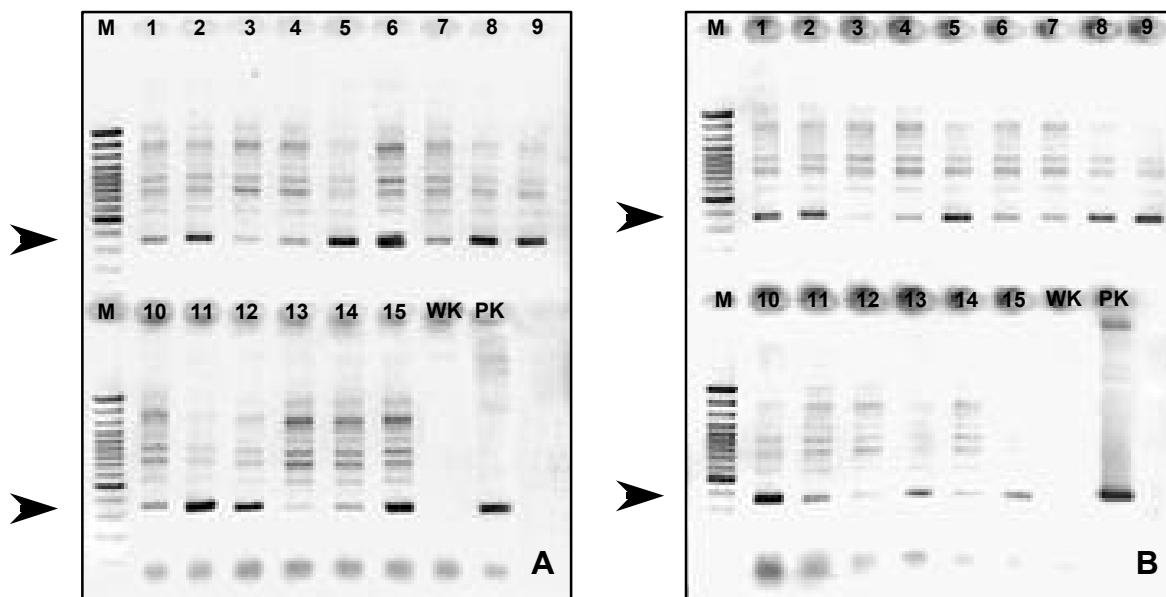


Abb. 26:

Elektrophoretische Auftrennung (2 % Agarose) verschiedener PCR-Produkte zum Nachweis der erfolgreichen Agroinfektion von *Nicotiana benthamiana*- (A) und *Datura stramonium*-Pflanzen (B) mit verschiedenen pLH 9000 px 8k-Konstrukten.

Template: Gesamt-DNA aus drei verschiedenen Bereichen agroinfizierter Pflanzen 14 Tage nach Infektion

Primerkombination: 35 sis/px 8k 18

erwartete Produktgröße: ~ 370 bp

**M:** 100 bp Plus Ladder; **1-3:** px 8k 1-46 P2A; **4-6:** px 8k 1-42 P2A; **7-9:** px 8k 1-41 P2A; **10-12:** px 8k 1-40 P2A; **13-15:** px 8k 1-39 P2A; **WK:** Wasserkontrolle; **PK:** Positivkontrolle (Plasmid pLH 9000 px 8k 1-42 P2A)

Selbst 21 Tage nach Agroinfektion waren keinerlei Symptome auf den Pflanzen zu beobachten. Die exprimierten P8-Teilstücke schienen damit keine toxische Wirkung auf die transfizierten Pflanzenzellen auszuüben. Somit sind bei konstitutiver Expression dieser P8-Sequenzen in transgenen Pflanzen im Hinblick auf eine Toxizitätsreaktion wahrscheinlich keine Schwierigkeiten zu erwarten.

### 2.1.6. Inokulation agroinfizierter *Datura stramonium*-Pflanzen mit pPVX P2A ATG

Nachdem ausgeschlossen werden konnte, daß von den P8-Teilstücken selbst eine nekrotisierende Wirkung ausgeht, stellte sich im Zusammenhang mit der geplanten Herstellung transgener Pflanzen außerdem die Frage, ob sich der bei Expression der

P8-Teilstücke über den infektiösen PVX-Klon zu beobachtende Hemmeffekt auch durch eine Expression *in trans* mit nachfolgender PVX-Infektion erreichen ließe.

Um erste Hinweise auf eine Übertragbarkeit der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse auf ein transgenes System zu erlangen, wurden jeweils drei *Datura stramonium*-Pflanzen erneut einer Agroinfektion mit den unter C 2.1.5. genannten Konstrukten unterzogen. 14 Tage nach Agroinfektion wurden diese Pflanzen zusätzlich mit dem infektiösen Klon pPVX P2A ATG inokuliert und die Symptombildung über einen Zeitraum von weiteren 21 Tagen beobachtet.

Mit Ausnahme der mit pLH 9000 px 8k 1-42 P2A agroinfizierten Pflanzen bildeten sich in allen übrigen Pflanzen ca. 10 Tagen nach PVX-Inokulation deutliche Symptome aus, die in ihrer Ausprägung weitgehend einer herkömmlichen, durch pPVX P2A ATG hervorgerufenen Infektion glichen. Auffällig war allein, daß im Fall der mit den pLH 9000-Konstrukten px 8k 1-41 P2A, 1-40 P2A und 1-39 P2A agroinfizierten Pflanzen sowohl auf mit dem PVX-Klon inokulierten Blättern als auch auf systemisch infizierten Blättern einige kleine, unregelmäßig geformte Nekrosen auftraten, die bei einer alleinigen pPVX P2A ATG-Infektion in diesem Maße nicht zu beobachten waren.

Anders verhielt es sich im Falle der mit pLH 9000 px 8k 1-42 P2A agroinfizierten Pflanzen. Hier waren erste Anzeichen einer PVX-Infektion erst 14-16 Tage nach PVX-Inokulation zu beobachten. Während des gesamten Beobachtungszeitraums blieb die Infektion wesentlich schwächer ausgeprägt als in den übrigen Pflanzen. Neben schwachen Chlorosen und geringem Blattrollen traten auch hier einige der kleinen Nekrosen auf, wie sie auch auf einigen anderen Pflanzen beobachtet werden konnten.

Offensichtlich besaß auch das nach Agroinfektion *in trans* exprimierte P8-Teilstück 1-42 P2A eine gewisse, hemmende Wirkung gegenüber PVX, während die übrigen Sequenzen - zumindest unter den hier vorliegenden Expressionsbedingungen - keinen Effekt gegenüber PVX zeigten.

#### 2.1.7. Expression des dritten *Triple gene block*-Proteins aus dem Potexvirus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)

Nachdem durch Expression bestimmter Sequenzbereiche des dritten *Triple gene block*-Proteins P8 aus PVX eine Hemmung der Virusausbreitung in einer PVX-infizierten Pflanze hervorgerufen werden konnte, war es interessant zu ermitteln, ob sich dieser Effekt auch mit heterologen Sequenzen erreichen ließe.

Um dieses in Erfahrung bringen zu können, wurden verschiedene Sequenzbereiche des TGBp3 P10 aus dem Potexvirus *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) in pPVX P2A eingebracht und auf ihr antivirales Potential hin getestet. Neben der ganzlängigen P10-Sequenz wurde die N-terminale sowie die C-terminale Hälfte des P10 für diese Untersuchungen verwendet. Letztere wurden hierbei so gewählt, daß sie den in C 2.1.2. untersuchten PVX-Teilstücken px 8k 1-42 bzw. px 8k 37-70 in den durch sie abgedeckten Sequenzbereichen entsprachen.

Für die Amplifikation dieser Sequenzen wurden der infektiöse cDNA-Klon pCymMV als Matrizen-DNA und die in Tab. 19 dargestellten Primerkombinationen genutzt.

Tab. 19: Beschreibung der pPVX P2A-Konstrukte mit verschiedenen Sequenzbereichen des *Triple gene block*-Proteins P10 aus CymMV

pPVX P2A Ascl mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
<b>cy 10k 1-91</b>	cy 10k 1/2	Aminosäuren 1-91 des P10
<b>cy 10k 1-62</b>	cy 10k 1/4	Aminosäuren 1-62 des P10
<b>cy 10k 57-91</b>	cy 10k 5/2	Aminosäuren 57-91 des P10

Jeweils 5 µg dieser Konstrukte wurden auf *Datura stramonium* abgerieben und die Symptombildung bis 21 Tagen nach Inokulation dokumentiert. Darüberhinaus wurde die Viruskonzentration nach 14 und 21 Tagen in inokulierten und systemisch infizierten Blättern mittels ELISA bestimmt.

Tab. 20: Zusammenfassung der nach Inokulation mit pPVX P2A-Konstrukten + verschiedene Bereiche der P10-Gensequenz aus CymMV auftretenden Symptombilder auf *Datura stramonium*.  
Die Beurteilung ergab sich aus dem Gesamtbild der über 21 Tage dokumentierten Symptombesobachtungen. Die Symptomstärke wurde durch direkten Vergleich der Symptomausprägungen in den mit verschiedenen Konstrukten inokulierten Pflanzen bestimmt.  
Hierbei galt: 1 - schwach; 2 - mittel; 3 - stark; 4 - sehr stark; ( ) - nur in geringem Maße.

pPVX P2A Ascl mit	Symptombildung					
	Stärke	Nekrosen		Chlorosen	Blattrollen	Blasenbildung
		inok.	system.			
cy 10k 1-91	1	✓	(✓)	-	-	-
cy 10k 1-62	4	✓	✓	✓	✓	✓
cy 10k 57-91	2	-	-	✓	✓	✓

Verglich man die hier zu beobachtenden Symptombilder (vgl. Tab. 20) mit den durch die verschiedenen P8-Teilstücke verursachten (vgl. C 2.1.3., Tab. 11), so zeigten sich erstaunliche Ähnlichkeiten in der Art der Symptomausprägung. Auch hier ließen sich die bereits für die verschiedenen P8-Teilstücke aus PVX definierten drei Symptomgruppen wiedererkennen (vgl. Abb. 27).

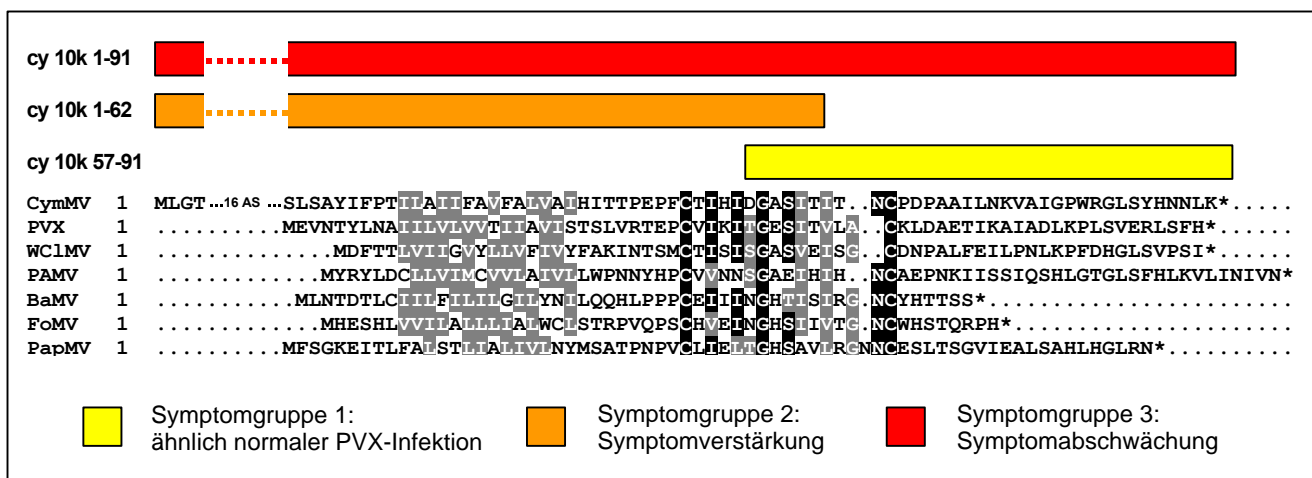


Abb. 27: Schematische Darstellung der verschiedenen über pPVX P2A Ascl in *Datura stramonium* exprimierten Bereiche des P10 aus CymMV im Zusammenhang mit dem dadurch verursachten Symptombild.

Das Alignment im unteren Bereich des Schemas zeigt einen Sequenzvergleich der TGBp3-Proteine verschiedener Potexviren. Die darüberliegenden Balken geben jeweils den Bereich der CymMV P10-Sequenz an, der durch die einzelnen P10-Teilstücke umfasst wird. Die Art des durch die P10-Sequenzen hervorgerufenen Symptombilds wird durch den verschiedenfarbigen Füllbereich der Balken angezeigt.

Der bei Expression des C-terminalen Teils cy 10k 57-91 entstehende Phänotyp ließ sich der Symptomgruppe 1 zuordnen, welche das Symptombild einer normalen PVX-Infektion repräsentierte. Die durch diese CymMV-Sequenz verursachten Symptome glichen damit denen, die durch das dieser Sequenz entsprechende PVX-Teilstück px 8k 37-70 hervorgerufen wurden.

Anders verhielt es sich in Bezug auf das ganzlängige P10 und dem N-terminalen Teil dieser Sequenz. Hier wich das tatsächliche Symptombild gänzlich von dem eventuell zu erwartenden ab. In Analogie zu dem PVX-P8-Teilstück px 8k 1-42 wäre für das damit vergleichbare cy 10k 1-62 möglicherweise ebenfalls ein Phänotyp der Symptomgruppe 3 und somit eine Virushemmung zu erwarten gewesen. Statt dessen zeigten die dieses Teilstück exprimierenden Pflanzen eine sehr starke Symptomausprägung mit heftigen lokalen sowie systemischen Nekrosen, Chlorosen, Blattrollen und Blasenbildung, wie sie für einen Phänotyp der Symptomgruppe 2 charakteristisch waren.

Eine Virushemmung trat dagegen bei Expression des ganzlängigen CymMV P10 auf. Vergleichbar mit einem Phänotyp der Symptomgruppe 3 bildeten sich hier zunächst nur wenige punktförmige Nekrosen auf den inokulierten Blättern. Später waren allerdings auch systemisch einige wenige dieser Nekrosen zu beobachten. Die Expression des ganzlängigen P10 verursachte damit einen ähnlichen Effekt wie einige der verkürzten P8-Teilstücke.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich offenbar auch mit heterologen TGBp3-Sequenzen eine Hemmung der PVX-Ausbreitung bewirken läßt. Zwar konnten die für die Teilstücke der homologen P8-Sequenz gewonnenen Erkenntnisse nicht vollständig auf das heterologe CymMV-System übertragen werden, da die einen antiviralen Effekt auslösenden Sequenzbereich der verschiedenen TGBp3-Proteine deutlich voneinander abwichen. Dennoch konnte aufgrund der starken Übereinstimmung der durch diese Sequenzen hervorgerufenen Symptombilder eindeutig ein ursächlicher Zusammenhang zwischen TGBp3-Sequenzen und Virushemmung festgestellt werden.

### 2.1.8. Expression des PVX-Hüllproteins

Zur Untersuchung des antiviralen Potentials des PVX-Hüllproteins, wurde die ganzlängige Hüllproteinsequenz sowie verschiedene 5'-verkürzte Teilsequenzen in pPVX P2A Ascl eingebracht und in *Datura stramonium* exprimiert.

Für die Amplifikation der einzelnen Sequenzen wurde das Konstrukt pPVX P2A Ascl als Matrizen-DNA zusammen mit den in Tab. 21 angegebenen Primerkombinationen benutzt. Es wurden folgende Konstrukte erstellt:

Tab. 21: Beschreibung der pPVX P2A-Konstrukte mit verschiedenen, teilweise verkürzten PVX-Hüllproteingen-Sequenzen

pPVX P2A Ascl mit	Primer-kombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
<b>px cp 1-238</b>	px cp 1/2	Aminosäuren 1-238 der Hüllprotein-Sequenz
<b>px cp 9-238</b>	px cp 3/2	Aminosäuren 9-238 der Hüllprotein-Sequenz
<b>px cp 17-238</b>	px cp 4/2	Aminosäuren 17-238 der Hüllprotein-Sequenz
<b>px cp 25-238</b>	px cp 5/2	Aminosäuren 25-238 der Hüllprotein-Sequenz
<b>px cp 33-238</b>	px cp 6/2	Aminosäuren 33-238 der Hüllprotein-Sequenz
<b>px cp 41-238</b>	px cp 7/2	Aminosäuren 41-238 der Hüllprotein-Sequenz

Jeweils 5 µg dieser Konstrukte wurden auf *Datura stramonium*-Pflanzen abgerieben. Die Symptombildung wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Inokulation dokumentiert und die Viruskonzentration in inokulierten und systemisch infizierten Blättern mittels ELISA bestimmt.

In sämtlichen inokulierten Pflanzen konnte 14 Tage nach Inokulation Virus in Konzentrationen nachgewiesen werden, wie sie für eine normale PVX-Infektion üblich waren. Auch die Symptomatik glich in allen Pflanzen einer typischen Infektion mit PVX, gekennzeichnet durch eine mittlere Symptomstärke mit mosaikartigen Chlorosen, Blattrollen und mäßiger Blasenbildung auf systemisch infizierten Blättern.

Hiermit schien die Überexpression des ganzlängigen PVX-Hüllproteins bzw. die Expression der im N-terminalen Bereich verkürzten Derivate keinerlei Einfluß auf die Ausbildung der durch pPVX P2A hervorgerufenen Infektion zu haben.

## 2.2. Untersuchung des antiviralen Potentials von Hüllproteingenen verschiedener Viren

Die zur Expression über das pPVX P2A Ascl-System verwendeten Hüllproteingen-Sequenzen stammten aus den Viren CIYVV, CymMV, PVY, TEV, TRV ON und TRV ORY. Für die Amplifikation wurden folgende Matrizen-DNAs und Primerkombinationen gewählt:

Tab. 22: Zur Amplifikation der Hüllproteingen-Sequenzen verschiedener Viren verwendete Matrizen-DNAs und Primerkombinationen

Hüllproteingen-Sequenz aus	Matrizen-DNA	Primer-kombination	resultierendes Konstrukt
<b>CIYVV</b>	pCIYVV Ascl/Nla	cy cp1/cycp2	pPVX cy cp
<b>CymMV</b>	pCymMV	cb cp 1/cb cp 2	pPVX cb cp
<b>PVY</b>	cDNA von PVY-Isolat	py cp 3/py cp2	pPVX py cp
<b>TEV</b>	pTEV H/C Ascl	te cp1/te cp 2	pPVX te cp
<b>TRV ON</b>	cDNA von TRV ON-Isolat	ON cp 1/ON cp 2	pPVX ON cp
<b>TRV ORY</b>	cDNA von TRV ORY-Isolat	ORY cp1/ORY cp2	pPVX ORY cp

Die Amplifikate wurden über Ascl in pPVX P2A Ascl eingebracht und die resultierenden Konstrukte auf *N. benthamiana*-Pflanzen abgerieben. Die Symptombildung wurde über den gesamten Testzeitraum von 21 Tagen dokumentiert und in regelmäßigen Abständen die Viruskonzentration mit Hilfe des ELISA ermittelt.

Als Kontrolle diente das Konstrukt pPVX P2A ATG. Dieses Konstrukt trägt lediglich ein Startcodon zwischen Hüllproteinpromotor und P2A-kodierender Sequenz, so daß hierüber lediglich das P2A-Oligopeptid und das PVX-Hüllprotein exprimiert werden. Eine insertspezifische Beeinflussung der Infektion sollte damit weitgehend ausgeschlossen werden können, so daß dieses Konstrukt als Referenz fungierte.

Die mit den verschiedenen Konstrukten inokulierten Pflanzen zeigten alle innerhalb eines normalen Zeitraums von 10-14 Tagen die ersten Symptome in Form von Blasenbildung, Blattrollen und netzartigen Chlorosen auf jungen systemisch infizierten Blättern. Die Symptomstärke sowie die Virusausbreitung entsprachen über den gesamten Probenzeitraum bei allen infizierten Pflanzen im wesentlichen der Kontrolle. Es konnten keine Hemmeffekte beobachtet werden. Auch die über ELISA ermittelten Viruskonzen-



trationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion lagen alle im Bereich der Kontrolle.

Da aufgrund der gekoppelten Expression von Fremdsequenz und PVX-Hüllprotein davon ausgegangen werden konnte, daß die ‚Fremd‘-Hüllproteine in der Pflanze zumindest kurzzeitig vorhanden waren, konnte aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, daß keines der über pPVX P2A exprimierten Hüllproteine eine Hemmwirkung gegenüber PVX auslöste. Ein antivirales Potential gegenüber PVX war im gegebenen Versuchssystem in diesen Sequenzen somit nicht vorhanden.

### 3. Expression von Hüllproteingenen verschiedener Viren als Sequenzen mit möglichem antiviralem Potential über pTEV H/C Ascl

Da virale Hüllproteinsequenzen sich in zahlreichen transgenen Systemen bereits als erfolgversprechende Kandidaten zur Resistenzzeugung erwiesen haben, wurde die Eignung des pTEV H/C-Systems zur Ermittlung des antiviralen Potentials von Nukleinsäuresequenzen anhand der Hüllproteingene verschiedener Viren getestet.

Zur Vereinfachung der Bezeichnung wird im folgenden der Zusatz ‚Ascl‘ im Namen der neuen Konstrukte weggelassen. Für alle nachfolgend beschriebenen Konstrukte gilt auch ohne zusätzliche Erwähnung, daß sie auf pTEV H/C Ascl basieren.

Für die Expression über pTEV H/C Ascl wurden die Hüllproteine der Viren CymMV, PVX, PVY und TRV ON gewählt. Folgende Matrizen-DNAs und Primerkombinationen wurden für die Amplifikation verwendet:

Tab. 23: Zur Amplifikation der Hüllproteingen-Sequenzen verschiedener Viren verwendete Matrizen-DNA und Primerkombinationen

Hüllproteingen-Sequenz aus	Matrizen-DNA	Primer-kombination	resultierendes Konstrukt
<b>CIYVV</b>	pCIYVVAscl/Nla	cy cp 1/cy cp 2	pTEV H/C cy cp
<b>CymMV</b>	pCymMV	cb cp 1/cb cp 2	pTEV H/C cb cp
<b>PVX</b>	pPVX 201	px cp 1/px cp2	pTEV H/C px cp
<b>PVY</b>	cDNA von PVY-Isolat	py cp 1/py cp2	pTEV H/C py cp
<b>TRV ON</b>	cDNA von TRV ON-Isolat	ON cp 1/ON cp 2	pTEV H/C ON cp
<b>TRV ORY</b>	cDNA von TRV ORY-Isolat	ORY cp 1/ORY cp 2	pTEV H/C ORY cp

Die Amplifikate wurden über Ascl in pTEV H/C Ascl eingebracht und die mit Bgl II linearisierten Konstrukte zur SP6-Transkription verwendet. 10 µl Transkriptionsansatz pro Blatt wurde auf eine *N. benthamiana*-Pflanze abgerieben. Die Symptombildung wurde über den gesamten Testzeitraum von 21 Tagen dokumentiert und die Viruskonzentration in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des ELISA ermittelt. Als Kontrolle

diente das pTEV H/C Ascl-Konstrukt ohne Insert, welches gleichzeitig mit den zu testenden Konstrukten abgerieben und beprobt wurde.

Die mit den verschiedenen Konstrukten inokulierten Pflanzen zeigten alle innerhalb eines normalen Zeitraums von 8-10 Tagen die ersten Symptome in Form von Blasenbildung und Blattrollen auf jungen systemisch infizierten Blättern. Die Symptomstärke sowie die Virusausbreitung entsprach über den gesamten Probenzeitraum bei allen infizierten Pflanzen im wesentlichen der Kontrolle. Es konnten keine Hemmeffekte beobachtet werden. Auch die über ELISA ermittelten Viruskonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion lagen alle im Bereich der Kontrolle.

Da davon ausgegangen werden konnte, daß die als Teil des TEV-Polypeptids exprimierten ‚Fremd‘-Hüllproteine auch in der Pflanze zumindest kurzzeitig vorhanden sein mussten, konnte aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, daß keines der verwendeten Hüllproteine eine Hemmwirkung gegenüber TEV auslöste. Ein antivirales Potential gegenüber TEV war damit im gegebenen System in diesen Sequenzen nicht vorhanden.

#### **4. Untersuchung der Bildung von virusähnlichen Partikeln durch über virale Vollängklone exprimierte Hüllproteine verschiedener Viren**

Nachdem die Expression von Hüllproteinsequenzen verschiedener Viren über die Vollängklone pPVX P2A Ascl und pTEV H/C Ascl nicht zu einer durch diese Proteine vermittelten Resistenz geführt hatte, bot sich die Gelegenheit, die durch die entsprechenden Konstrukte infizierten Pflanzen für eine Untersuchung auf anderer Ebene zu nutzen. Es stellte sich die Frage, ob die über die viralen Systeme exprimierten Hüllproteine in der Lage sein könnten, zu virusähnlichen Partikeln (VLPs: *virus-like particles*) zu aggregieren. Eine derartige Beobachtung würde die Möglichkeit eröffnen, die Partikelbildungsfähigkeit viraler Hüllproteine in einem pflanzlichen System zu studieren.

##### **4.1. Untersuchung der Bildung virusähnlicher Partikel durch über pPVX P2A Ascl exprimierte Hüllproteine verschiedener Viren**

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden *N. benthamiana*-Pflanzen mit den unter C 2.2., Tab. 22 beschriebenen Konstrukten inokuliert. 12-18 Tage nach Inokulation wurden Proben des infizierten Blattmaterials im ISEM mit Dekorationstest untersucht. Zur Detektion der PVX-Partikel wurde PVX-spezifisches Immunglobulin verwendet, während der Nachweis der eventuell durch die exprimierten ‚Fremd‘-Hüllproteine entstandenen VLPs mit Hilfe der für die entsprechenden Viren spezifischen Immunglobuline erfolgte.

Tab. 24: Ergebnisse des ISEM + Dekorationstest der mit verschiedenen pPVX-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen (r: 1 Partikel pro 10 Beobachtungsfelder; +: 1-10 Partikel pro Beobachtungsfeld; ++: 10 - 100 Partikel pro Beobachtungsfeld)

Wirtspflanze infiziert mit	Nachweis mit PVX-spezifischem Immunglobulin	Nachweis mit Fremdprotein-spezifischem Immunglobulin
pPVX cy cp	++ Fäden stark dekoriert	r Fäden undekoriert
pPVX cb cp	++ Fäden stark dekoriert	+ Fäden undekoriert
pPVX py cp	++ Fäden stark dekoriert	+ Fäden undekoriert; r - + kurze Fäden mittel dekoriert
pPVX te cp	++ Fäden stark dekoriert	r Fäden undekoriert; + - ++ Fäden stark dekoriert
pPVX ON cp	++ Fäden stark dekoriert	r Fäden undekoriert; + Stäbchen stark dekoriert
pPVX ORY cp	++ Fäden stark dekoriert	r Fäden undekoriert; + Stäbchen stark dekoriert

Die in Tab. 24 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, daß im Fall des CIYVV- und des CymMV-Hüllproteins keine durch das Fremdprotein gebildeten VLPs nachgewiesen werden konnten. Lediglich einige unspezifisch gebundene nicht dekorierte PVX-Partikel waren auf den mit CIYVV- bzw. CymMV-spezifischen IgGs behandelten Netzen zu beobachten. Da im pPVX P2A-System eine nicht erfolgte Expression auszuschließen war, konnten die Gründe für eine fehlende VLP-Bildung nur in der Unfähigkeit der exprimierten Proteine zur Aggregation oder in dem vorzeitigen Abbau dieser Proteine durch pflanzeigenen Proteasen liegen. Um sicherzustellen, daß ausreichend ‚Fremd‘-Hüllprotein vorhanden war, wurden Proteinextrakte aus den infizierten Pflanzen einer Western-Analyse zum Nachweis des Fremdproteins unterzogen (s.u.).

In den übrigen Pflanzen ließen sich dagegen neben den PVX-typischen Fäden durch ‚Fremd‘-Hüllprotein gebildete VLPs nachweisen. Im Fall des PVY- und des TEV-Hüllproteins konnten durch Dekoration mit den entsprechenden Antikörpern spezifisch markierte Fäden beobachtet werden, wie sie für diese Viren typisch sind (vgl. Abb. 28.1 und 28.2). Die exprimierten Hüllproteine der TRV-Isolate ON und ORY aggregierten zu morphologisch deutlich von den fadenförmigen PVX-Partikeln zu unterscheidenden Stäbchen, die sogar den für diese Viren charakteristischen Zentralkanal aufwiesen (vgl. Abb. 28.3 + 28.4).

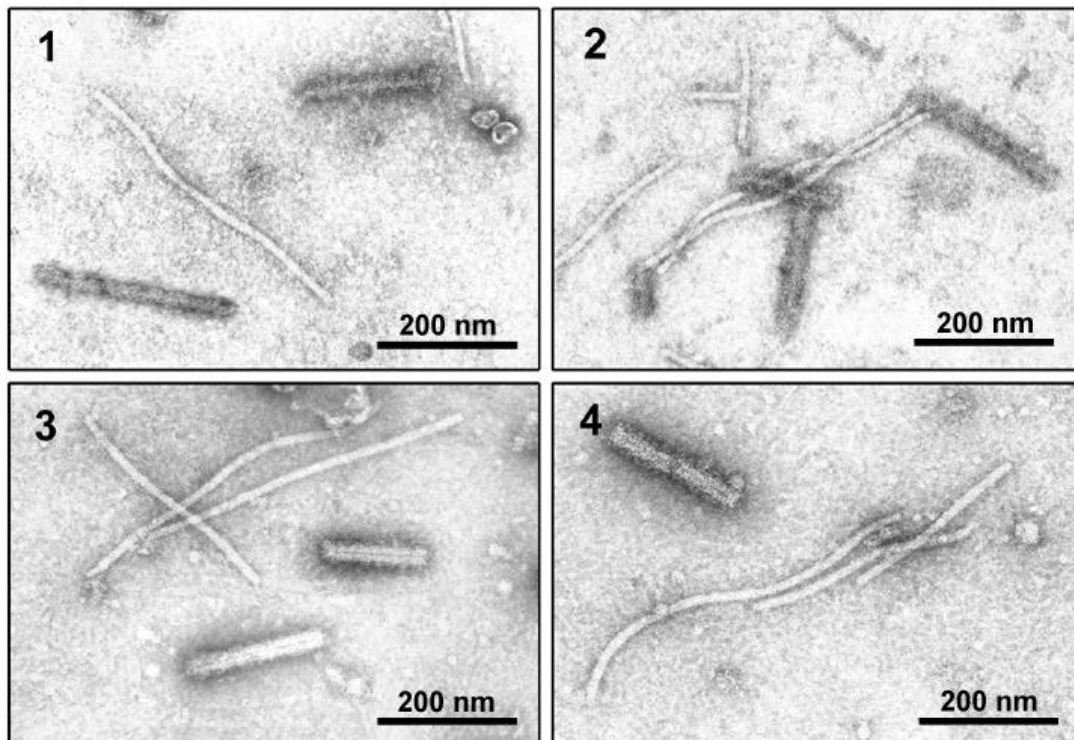


Abb. 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der durch die über pPVX P2A Ascl exprimierten Hüllproteine verschiedener Viren gebildeten Partikel. **1:** Partikelbildung in pPVX py cp-infizierten Pflanzen: PVX-Partikel (undekoriert) und aus PVY-Hüllprotein gebildete VLPs (dekoriert); **2:** Partikelbildung in pPVX te cp-infizierten Pflanzen: PVX-Partikel (undekoriert) und aus TEV-Hüllprotein gebildete VLPs (dekoriert); **3:** Partikelbildung in pPVX ON cp-infizierten Pflanzen: fadenförmige PVX-Partikel (undekoriert) und stäbchenförmige, aus TRV ON-Hüllprotein gebildete VLPs (dekoriert); **4:** Partikelbildung in pPVX ORY cp-infizierten Pflanzen: fadenförmige PVX-Partikel (undekoriert) und stäbchenförmige, aus TRV ORY-Hüllprotein gebildete VLPs (dekoriert). Die Längen der Balken entsprechen einer Größe von 300 nm.

Zum Nachweis der über den viralen Vollängenklon gebildeten Hüllproteine wurden Gesamtproteinextrakte aus den infizierten Pflanzen einer Western-Analyse unterzogen.

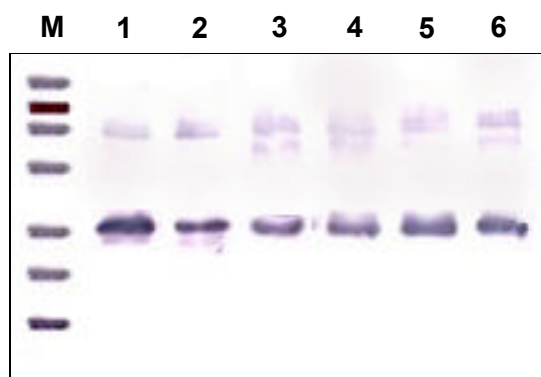


Abb. 29:

Immunoblot einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pPVX-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen

Nachweis des PVX-Hüllproteins mit PVX-spezifischem IgG aufgetragene Menge: 1 µl des Gesamtproteinextrakts

**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder; **1:** pPVX cy cp; **2:** pPVX cb cp; **3:** pPVX py cp; **4:** pPVX te cp; **5:** pPVX ON cp; **6:** pPVX ORY cp

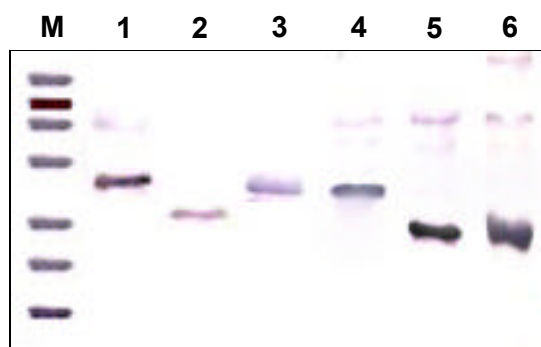


Abb. 30:

Immunoblot einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pPVX-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen

Nachweis der verschiedenen 'Fremd'-Hüllproteine mit entsprechend spezifischem IgG aufgetragene Menge: 10 µl des Gesamtproteinextrakts

**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder; **1:** pPVX cy cp; **2:** pPVX cb cp; **3:** pPVX py cp; **4:** pPVX te cp; **5:** pPVX ON cp; **6:** pPVX ORY cp

über pPVX P2A Ascl exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa
PVX cp	25.1
CIYVV cp	33.7
CymMV cp	25.5
PVY cp	31.7
TEV cp	31.3
TRV ON cp	24.2
TRV ORY cp	24.1

Tab. 25:  
Molekulargewichte der unterschiedlichen  
über pPVX P2A Ascl exprimierten Hüll-  
proteine verschiedener Viren

Die Western-Analyse zeigte, daß in allen Proben sowohl das PVX-Hüllprotein als auch das jeweilige ‚Fremd‘-Hüllprotein nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 29 + 30).

Die über pPVX P2A Ascl exprimierten ‚Fremd‘-Hüllproteine wiesen ein um ca. 1.7 kDa höheres Molekulargewicht auf als die natürlichen viralen Hüllproteine. Dies war auf die zusätzliche Sequenz des C-terminal anhängenden P2A-Oligopeptids zurückzuführen, dessen Molekulargewicht eben diesem Wert entspricht.

Da in allen infizierten Pflanzen offensichtlich das entsprechende ‚Fremd‘-Hüllprotein vorlag, konnte ausgeschlossen werden, daß es im Fall des CIYVV und des CymMV aufgrund fehlenden Hüllproteins nicht zu einer VLP-Bildung kam. Die über pPVX P2A exprimierten Hüllproteine dieser Viren waren somit offensichtlich nicht in der Lage, zu VLPs zu aggregieren. Weitergehende Untersuchungen an den Hüllproteinen dieser Viren wurden daher nicht durchgeführt.

## 4.2. Bildung virusähnlicher Partikel durch verkürzte und veränderte Hüllproteine verschiedener Viren im pPVX P2A-System

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die über pPVX P2A Ascl exprimierten ganzlängigen Hüllproteine des PVY, des TEV, des TRV ON und des TRV ORY zu virusähnlichen Partikeln aggregierten, schien es interessant zu ermitteln, welche N- bzw. C-terminalen Bereiche für die Fähigkeit zur VLP-Bildung essentiell sind. Hierzu wurden die Hüllproteine dieser Viren durch sukzessive Deletionen am N- und am C-Terminus verkürzt bzw. durch Austausch bestimmter Aminosäuren verändert. Die modifizierten Hüllproteine wurden über Ascl in pPVX P2A Ascl integriert und die entstandenen Konstrukte auf *N. benthamiana*-Pflanzen abgerieben.

Je nach Auftreten der ersten Symptome wurden von den infizierten Pflanzen 10-18 Tage nach Inokulation Proben genommen und sowohl im ELISA als auch durch Immunelektronenmikroskopie auf das Vorhandensein von VLPs hin untersucht. Desweiteren wurde zum Nachweis der exprimierten Hüllproteine eine Western-Analyse mit aus den infizierten Pflanzen gewonnenem Gesamtprotein durchgeführt.

### 4.2.1. Bildung virusähnlicher Partikel durch verschieden verkürzte und veränderte Sequenzen des TRV ON-Hüllproteins

Zur Identifizierung der für die TRV ON-Partikelbildung essentiellen N- und C-terminalen Bereiche wurden nicht nur verschieden verkürzte Hüllproteinsequenzen untersucht, sondern es wurden auch gezielte Mutationen in bestimmten Motiven des TRV ON-Hüllproteins gesetzt. Diese Motive zeichnen sich dadurch aus, daß sie innerhalb der Hüllproteinsequenzen von Viren mit stäbchenförmigen Partikeln stark konserviert sind (vgl. Abb. 31). Dieser hohe Konservierungsgrad läßt darauf schließen, daß es sich

hierbei um funktionsrelevante Bereiche handelt, die möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Bildung stäbchenförmiger Partikel spielen.

TRV ON (Tobra)	1	.....MAGT	MGESFEG...KILDDL	S	GAWVEKHNWSDVLKRLTKIKFALQAD	R	MIPGIVEDLNTE.....IPVDE
TRV ORY (Tobra)	1	.....MTDGM	DEEFD...SKALNET	F	SPWVEEKNWVDLMRLSAMKFALQAD	R	KIPGVLSDLKKD.....CPFSA
PCV (Pecclu)	1	MSNIAEVS	RGGGHV	G	VDPWQHIIKRNINADWWIRLDHWETLLAD	L	RGVSFEVNSSRSQVADF
BSMV (Hordei)	1	MPNVSL	TAKGGGH	I	EDQWDTQVVEAGVFDDWWVHVWAENKFL	D	NLRGINFSVASSRSQVAEYLAALDRD.....LPADV
BSBV (Pomo)	1	.....MVDPR	MEGWNQR...EAI	R	AKRRFVSYDTFMDLIVNWREVRVGIIEH	S	ATILSQVSRLEGEA.....NFYGR
SBWMV (Furo)	1	.....MAV	NKG	T	GYNKE...LNAMAATHAYIRLSTLMSQ	I	ESWQATRASVLT
BNYVV (Beny)	1	.....MSSE	GRY	M	TWKDM...SHNK	F	MTDRWARVSDVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGS
TMV (Tobamo)	1	.....MS	SITTP...SQ	F	VFLSSAWADPIELINLCTNALGNQ	F	QTQARTVVQRQFSEVWK.....PSPQV
TRV ON (Tobra)	64	FTRE	PAGKVYHLLSKEVLM	A	IEA	I	HAASSFKRRAEKNNVN...PRQRFDAEGSATQLNPGGT
TRV ORY (Tobra)	65	FKRE	PDKEMWSKLTKEA	V	I	A	LQIAASSFKRRADEKNAVSG
PCV (Pecclu)	76	SVRE	PGPRGNLGSTN	.Y	T	E	VYF.VRIKSELKQKLSLIAADQG.KNRDVEIGRPNAPVSTGAGGNQ
BSMV (Hordei)	76	DRRE	PAGARGQIGSPN	.Y	L	P	AKFFLRDKRTIAELTRLSRLTDQPHNNRDIELNRAKRATTNPSPPAQ...APSENLT
BSBV (Pomo)	65	TKRE	GRVDT.NGDVF	.Y	V	D	LSEA....RIRKILDNII.IALQTTSGEG...RAKRLG.KEASTTA.....
SBWMV (Furo)	66	TKRE	GAHTS.DGDEI	.F	C	D	LGE....AVTQILSRLT.VALQSARGEQAQTRNAKGAAPGTSQVENE...
BNYVV (Beny)	71	MTRE	PQTLTMYGALVLYV	N	L	S	DEP...IMTKVNTLTDSSL...ADNASANVRDVVSGNKAESSGKTA.....
TMV (Tobamo)	60	TVRE	PDS...DFKVYRYNAV	.....LD	P	L	VTALLGAFDTRNRIIEVENQANPTTAETLDAT.....R
TRV ON (Tobra)	140	MFSN	SKLDDASTAFHKSLAT	L	K	G.....SRPKAVVQRT	FE
TRV ORY (Tobra)	144	SFSF	GKFDASTAYHKALS	Y	L	E.....LNLKPLYRRQ	FE
PCV (Pecclu)	152	RDQ	PLRDGSLHYRYLVQ	D	I.....ELAGAEQ	F	DRALEETFS
BSMV (Hordei)	150	RDV	QPLKDSALHYQYV	L	I	D.....QSARLPVY	TRKTF
BSBV (Pomo)	119	...GA	EDSALNVAHQLAE	L	A	E	LMTSDQFIEDACFTREKEFEHVG
SBWMV (Furo)	128	...Q	QTDQTLAISNAVAELM	.F	V	R	KDFTMNECYTQDSFEAKYNLKEGSS*
BNYVV (Beny)	136	...G	TNENSAYTLTVSLAGLAQ	A	L	R	LEELM...WTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTPSPGQ*
TMV (Tobamo)	114	RVDD	ATVAIRSAINNL	L	I	V	EL.....IRGTGSYNRSSFE

Abb. 31: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine verschiedener Viren mit stäbchenförmigen Partikeln (nach Koenig et al., 1997)  
Die in allen Sequenzen vorkommenden konservierten Aminosäuren sind schwarz unterlegt.

Die Untersuchungen befassten sich mit folgenden in stäbchenförmigen Viren hochkonservierten Bereichen der TRV ON-Hüllproteinsequenz:

1. ein Tyrosinrest im N-terminalen Bereich in Position 5 (Y<sub>5</sub>)
2. ein Glutaminsäurerest als Teil eines durch Phenylalanin und Glutaminsäure gebildeten (FE)-Motivs am C-Terminus in Position 174 (E<sub>174</sub>)
3. ein C-terminaler Leucinrest in Position 179 (L<sub>179</sub>) und
4. ein Tryptophanrest in Position 181 ebenfalls am C-Terminus (W<sub>181</sub>)

Die Codons für diese Aminosäuren wurden durch einen PCR-vermittelten Nukleotid austausch in für verschiedene andere Aminosäuren kodierende Triplets umgewandelt und der Einfluß dieser Mutationen auf die VLP-Bildung durch Expression über das pVX P2A-System getestet.

Für die Amplifikation der untersuchten Hüllproteinsequenzen wurde TRV ON-cDNA als Matrizen-DNA zusammen mit den in Tab. 26 angegebenen Primerkombinationen benutzt. Es wurden folgende Konstrukte erstellt:

Tab. 26: Beschreibung der pPVX P2A-Konstrukte mit verschiedenen verkürzten und mutierten TRV ON-Hüllprotein-Sequenzen

<b>pPVX P2A Ascl mit</b>	<b>Primerkombination</b>	<b>Beschreibung des exprimierten Proteins</b>
<b>ON cp 5-210</b>	ON cp 3/ON cp 2	N-terminal um 4 AS verkürzt
<b>ON cp 6-210</b>	ON cp 6/ON cp 2	N-terminal um 5 AS verkürzt
<b>ON cp 1-181</b>	ON cp 1/ON cp 4	C-terminal um 29 AS verkürzt
<b>ON cp 1-180</b>	ON cp 1/ON cp 9	C-terminal um 30 AS verkürzt
<b>ON cp 1-179</b>	ON cp 1/ON cp 10	C-terminal um 31 AS verkürzt
<b>ON cp 1-178</b>	ON cp 1/ON cp 11	C-terminal um 32 AS verkürzt
<b>ON cp 5-181</b>	ON cp 3/ON cp 4	N-und C-terminal um 4 bzw. 29 AS verkürzt
<b>ON cp 5-210 Y®A</b>	ON cp 16/ON cp 2	N-terminal um 4 AS verkürzt; mit Tyrosin (Y <sub>5</sub> ) zu Alanin (A)
<b>ON cp 5-210 Y®F</b>	ON cp 15/ON cp 2	N-terminal um 4 AS verkürzt; mit Tyrosin (Y <sub>5</sub> ) zu Phenylalanin (F)
<b>ON cp 5-210 Y®R</b>	ON cp 5/ON cp 2	N-terminal um 4 AS verkürzt; mit Tyrosin (Y <sub>5</sub> ) zu Arginin (R)
<b>ON cp 5-210 Y®S</b>	ON cp 17/ON cp 2	N-terminal um 4 AS verkürzt; mit Tyrosin (Y <sub>5</sub> ) zu Serin (S)
<b>ON cp 1-181 E®A</b>	ON cp 1/ON cp 8	C-terminal um 29 AS verkürzt; mit Glutaminsäure (E <sub>174</sub> ) zu Alanin (A)
<b>ON cp 1-181 E®D</b>	ON cp 1/ON cp 18	C-terminal um 29 AS verkürzt; mit Glutamin- (E <sub>174</sub> ) zu Asparaginsäure (D)
<b>ON cp 1-181 E®R</b>	ON cp 1/ON cp 7	C-terminal um 29 AS verkürzt; mit Glutaminsäure (E <sub>174</sub> ) zu Arginin (R)
<b>ON cp 1-181 L®V</b>	ON cp 1/ON cp19	C-terminal um 29 AS verkürzt; mit Leucin (L <sub>179</sub> ) zu Valin (V)
<b>ON cp 1-181 W®A</b>	ON cp 1/ON cp 20	C-terminal um 29 AS verkürzt; mit Tryptophan (W <sub>181</sub> ) zu Alanin (A)
<b>ON cp 1-181 Y« W</b>	ON cp 25/ON cp 26	C-terminal um 29 AS verkürzt; mit Tyrosin (Y <sub>5</sub> ) zu Tryptophan (W) und Tryptophan (W <sub>181</sub> ) zu Tyrosin (Y)

#### 4.2.1.1. Virusnachweis im ELISA und immunelektronenmikroskopische Untersuchung

In allen infizierten Pflanzen konnten mittels ELISA PVX-Partikel nachgewiesen werden. Sämtliche Konstrukte waren damit infektiös.

Für die Detektion der virusähnlichen Partikel wurde ein ISEM mit Dekorationstest unter Verwendung von TRV ON-spezifischem Immunglobulin durchgeführt.

Es zeigte sich, daß im N-terminalen Bereich die ersten 4 Aminosäuren ohne Beeinflussung der VLP-Bildung deletiert werden konnten (vgl. Abb. 32). Wurde jedoch das stark konservierte Tyrosin (Y<sub>5</sub>) ebenfalls entfernt, so wurden im EM keine stäbchenförmigen durch TRV ON-Hüllprotein gebildeten VLPs mehr detektiert.

C-terminal war dagegen eine Deletion von bis zu 30 Aminosäuren möglich. Demnach wurde überraschenderweise die Entfernung des konservierten Tryptophans (W<sub>181</sub>) noch

toleriert, während das Fehlen des davorliegenden, nicht konservierten Lysins (K<sub>180</sub>) schließlich zum Ausbleiben der VLP-Bildung führte.

Wurde die TRV ON-Hüllproteinsequenz gleichzeitig am N- und am C-Terminus um die Anzahl an Aminosäuren verkürzt, die, wenn sie nur an einem Ende auftraten, noch akzeptiert wurden (4 bzw. 29 Aminosäuren), so konnten auch hier keine VLPs mehr beobachtet werden.

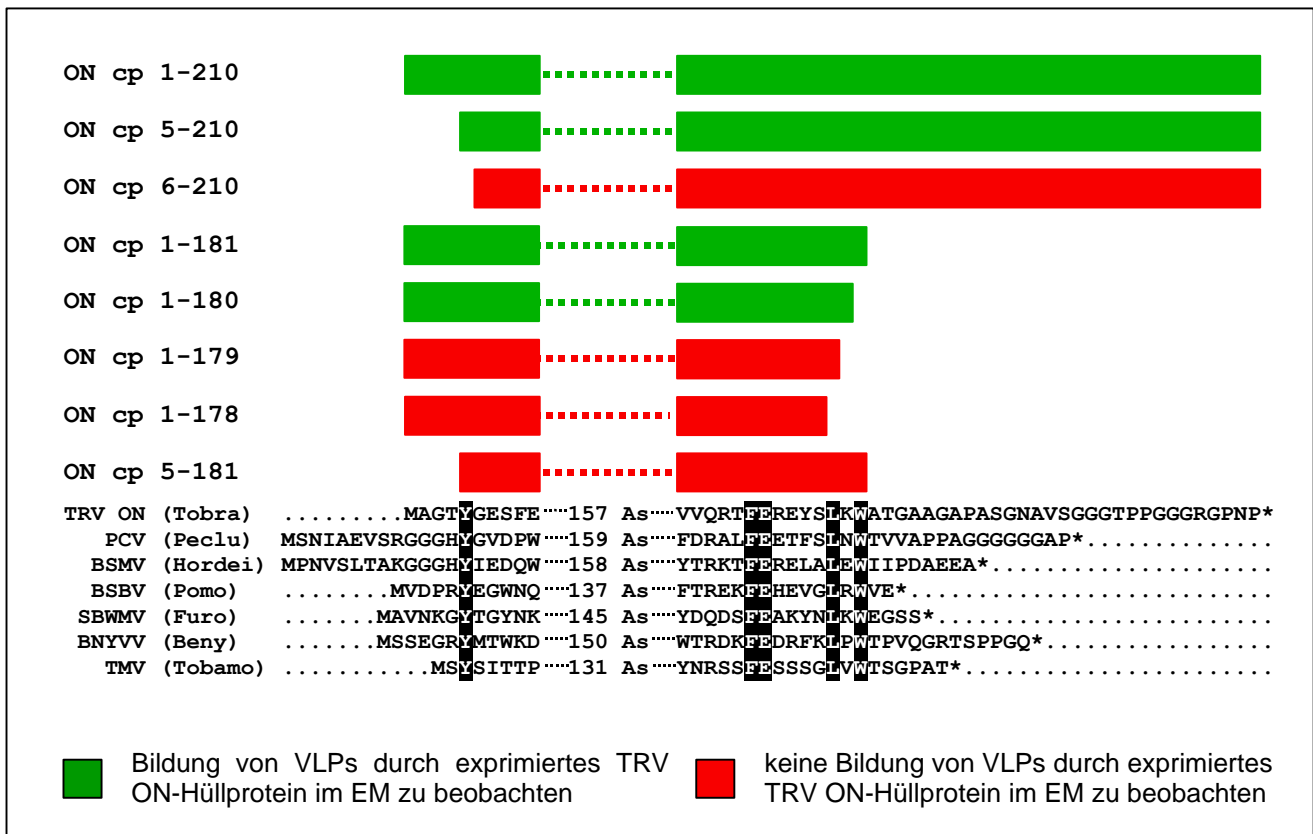


Abb. 32: Schematische Darstellung der VLP-Bildungsfähigkeit der über pPVX P2A Ascl exprimierten, verschieden verkürzten TRV ON-Hüllproteine.

Die Balken über dem Alignment der Hüllproteinsequenzen verschiedener Viren mit stäbchenförmigen Partikeln geben den exprimierten Bereich der TRV ON-Hüllproteinsequenz an.

Ähnlich verhielt es sich bei dem Austausch einzelner konservierter Aminosäuren zusätzlich zu den noch tolerierten Deletionen (vgl. Abb. 33). Sobald an die Stelle der Aminosäuren Tyrosin (Y<sub>5</sub>) am N-Terminus bzw. Glutaminsäure (E<sub>174</sub>), Leucin (L<sub>179</sub>) oder Tryptophan (W<sub>181</sub>) am C-Terminus eine andere Aminosäure gesetzt wurde, konnten keine VLPs mehr festgestellt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß es sich bei diesen Motiven um für die VLP-Bildung essentielle Aminosäuren handelt. Im Fall der Doppelmutante ON cp 1-181 Y↔W wurden zusätzlich zu einer C-terminalen Verkürzung das N-terminale Tyrosin und das C-terminale Tryptophan gegeneinander ausgetauscht. Diese beiden Aminosäuren interagieren vermutlich im gefalteten Protein miteinander und sorgen so für den Zusammenhalt der Polypeptidkette (Namba et al., 1989). Bei einem wechselseitigen Austausch könnte diese Verbindungsfunktion eventuell erhalten bleiben und so eine VLP-Bildung durch das so veränderte Hüllprotein ermöglichen. Wie die elektronenmikroskopische Untersuchung allerdings zeigte, war dies nicht der Fall.



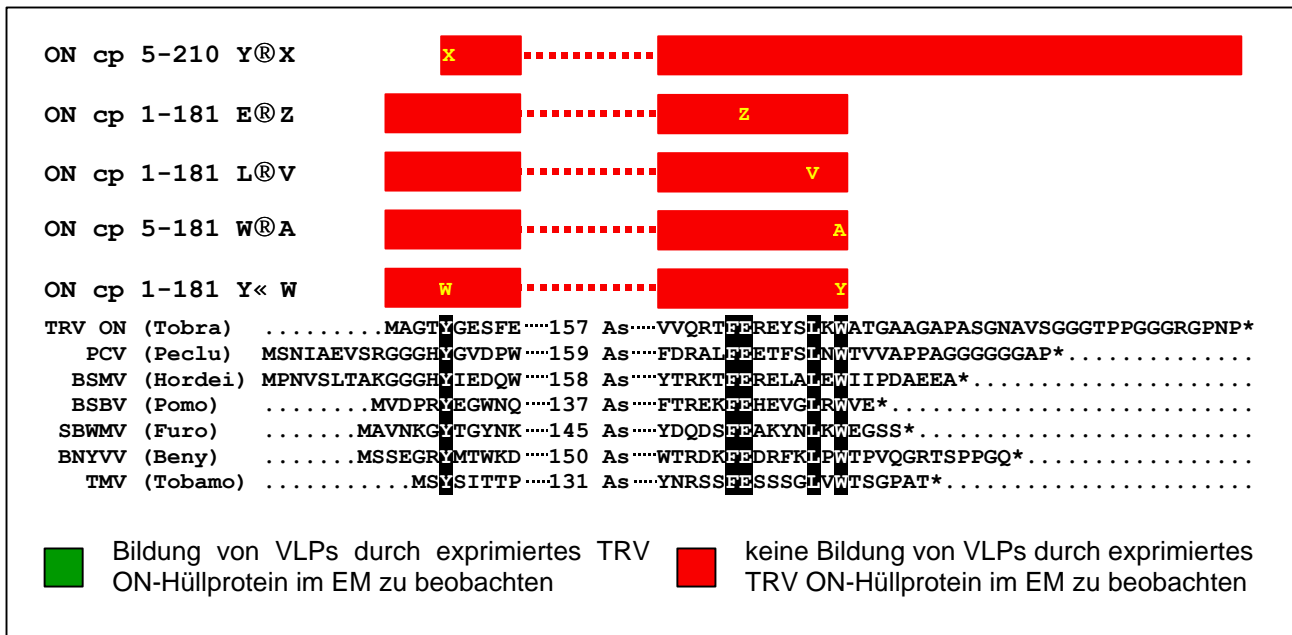


Abb. 33: Schematische Darstellung der VLP-Bildungsfähigkeit der über pPVX P2A Ascl exprimierten, verschieden verkürzten und veränderten TRV ON-Hüllproteine.

Die Balken über dem Alignment der Hüllproteinsequenzen verschiedener Viren mit stäbchenförmigen Partikeln geben den exprimierten Bereich der TRV ON-Hüllproteinsequenz an. X steht für die zum Austausch des Tyrosin (Y) verwendeten Aminosäuren Alanin (A), Phenylalanin (F), Arginin (R) und Serin (S), während Z die zum Austausch der Glutaminsäure (E) verwendeten Aminosäuren Alanin (A), Asparaginsäure (D) und Arginin (R) bezeichnet.

Um sicherzustellen, daß das Ausbleiben von durch TRV ON-Hüllprotein gebildeten VLPs in den genannten Fällen nicht darauf zurückzuführen war, daß aufgrund eines proteolytischen Abbaus kein TRV ON-Hüllprotein in den infizierten Pflanzen zur Verfügung stand, wurden Gesamtproteinextrakte dieser Pflanzen hergestellt und einer Western-Analyse unterzogen.

#### 4.2.1.2. Western-Analyse der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten TRV ON-Hüllproteinsequenzen

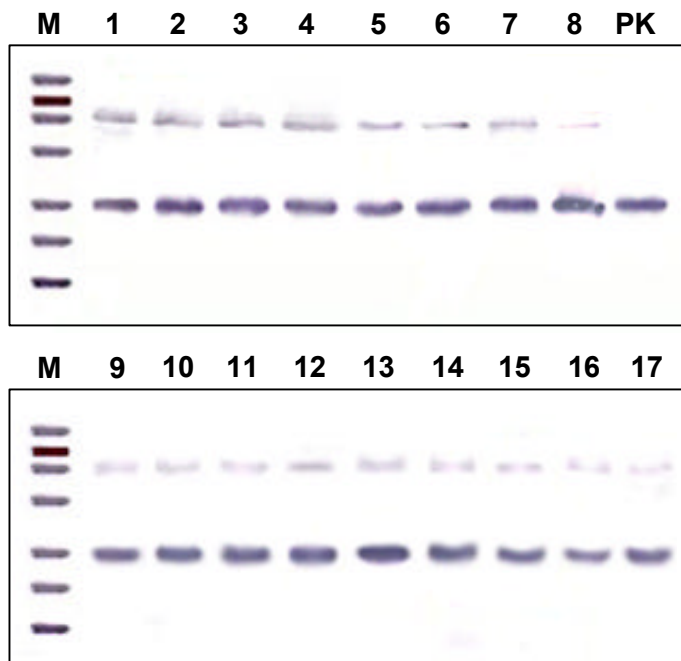


Abb. 34:

Immunoblots einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pPVX TRV ON cp-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen

Nachweis des PVX-Hüllproteins mit PVX-spezifischem IgG

aufgetragenen Menge: 1 µl des Gesamtproteinextrakts

**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder;

**1:** ONcp 5-210; **2:** ONcp 6-210;

**3:** ONcp 1-181; **4:** ONcp 1-180;

**5:** ONcp 1-179; **6:** ON cp 1-178;

**7:** ON cp 5-181; **8:** ON cp 1-181 Y↔W;

**9:** ONcp 5-210 Y→A; **10:** ONcp 5-210 Y→F;

**11:** ONcp 5-210 Y→R; **12:** ONcp 5-210 Y→S;

**13:** ONcp 1-181 E→A; **14:** ONcp 1-181 E→D;

**15:** ONcp 1-181 E→R; **16:** ONcp 1-181 L→V;

**17:** ONcp 1-181 W→A; **PK:** PVX-Positivkontrolle

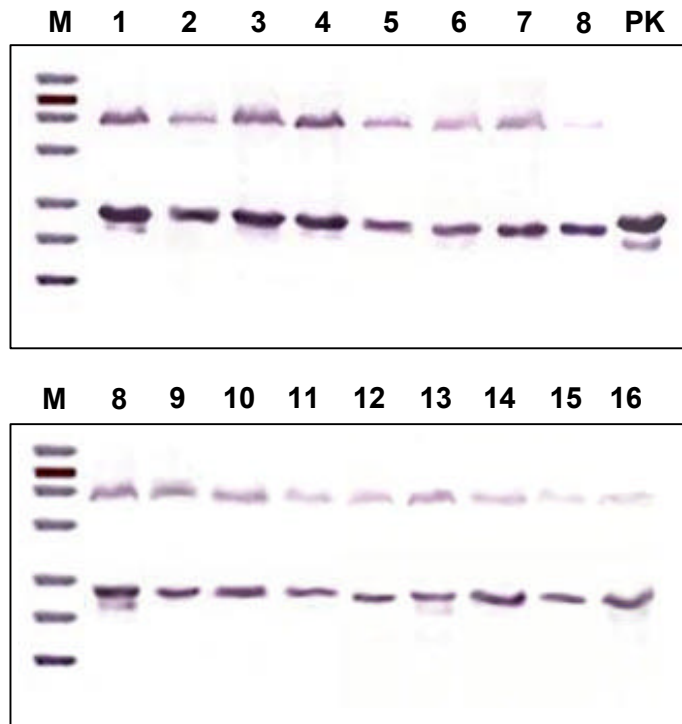


Abb. 35:

Immunoblots einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pPVX TRV ON cp-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen

Nachweis des TRV ON-Hüllproteins mit TRV ON-spezifischem IgG  
aufgetragenen Menge: 10 µl des Gesamtproteinextrakts

**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder;  
**1:** ONcp 5-210; **2:** ONcp 6-210;  
**3:** ONcp 1-181; **4:** ONcp 1-180;  
**5:** ONcp 1-179; **6:** ON cp 1-178;  
**7:** ON cp 5-181; **8:** ON cp 1-181 Y↔W;  
**9:** ONcp 5-210 Y→A; **10:** ONcp 5-210 Y→F;  
**11:** ONcp 5-210 Y→R; **12:** ONcp 5-210 Y→S;  
**13:** ONcp 1-181 E→A; **14:** ONcp 1-181 E→D;  
**15:** ONcp 1-181 E→R; **16:** ONcp 1-181 L→V;  
**17:** ONcp 1-181 W→A; **PK:** TRV ON Positivkontrolle

über pPVX P2A Ascl exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa
PVX cp	25.1
ON cp 5-210 <sup>*)</sup>	23.8
ON cp 6-210	23.7
ON cp 1-181 <sup>*)</sup>	21.9
ON cp 1-180	21.7
ON cp 1-179	21.6
ON cp 5-181	21.4
TRV ON -Positivkontrolle	22.5

<sup>\*)</sup> angegebene Werte gelten auch für entsprechende Deletionsmutanten

Tab. 27:

Molekulargewichte der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten Hüllproteine

In der Western-Analyse konnte in allen infizierten Pflanzen sowohl das PVX- als auch die verschiedenen verkürzten und veränderten TRV ON-Hüllproteine nachgewiesen werden (vgl. Abb. 34 und Abb. 35). Die Laufstrecken der Proteinbanden entsprachen dabei den für das jeweilige Protein erwarteten Größen (vgl. Tab. 27). Die Tatsache, daß die Laufstrecke für die verkürzten TRV ON-Hüllproteine kürzer ist als die des aus einer TRV ON-infizierten Pflanze extrahierten Hüllproteins, war darauf zurückzuführen, daß sich am C-Terminus der über pPVX P2A exprimierten Hüllproteine zusätzlich die Sequenz des P2A-Oligopeptids befand, welche das Molekulargewicht dieser Proteine um ~1.7 kDa erhöhte.

Darüberhinaus war neben der erwarteten Bande für PVX- bzw. TRV ON-Hüllprotein in allen Proben eine zusätzliche schwache Bande bei ca. 48 kDa zu beobachten. Hierbei handelte es sich um das zu einem geringen Teil entstehende Fusionsprotein aus TRV ON-Hüllprotein, P2A und PVX-Hüllprotein.

Auffällig war zudem, daß das PVX-Hüllprotein in deutlich größeren Mengen vorlag als das TRV ON-Hüllprotein. Die Bandenstärke im Falle des PVX-Hüllproteins war schätzungsweise bis zu 8-mal höher als die des TRV ON-Hüllproteins, obwohl von letzterem

bereits die 10-fache Menge an Gesamtproteinextrakt aufgetragen wurde. Ein genauer Mengenvergleich war hier allerdings nicht möglich, da der Proteingehalt der Gesamtproteinextrakte zuvor nicht bestimmt wurde und daher keine äquivalenten Proteinmengen aufgetragen werden konnten. Möglicherweise könnten diese Unterschiede auch auf unterschiedliche Titer der verwendeten Immunglobuline zurückzuführen sein.

Mit Hilfe der Western-Analyse konnte sichergestellt werden, daß in allen infizierten Pflanzen TRV ON-Hüllprotein vorhanden war. Allerdings ließ allein der Nachweis des TRV ON-Hüllproteins in der Western-Analyse keine Schlüsse darauf zu, ob die exprimierten Hüllproteine, bei denen keine VLPs im EM zu beobachten waren, auch tatsächlich nicht zur VLP-Bildung befähigt waren oder ob diese durch die Verwendung serologischer Nachweismethoden nur nicht detektiert werden konnten. Besonders im Fall der stark deletierten Hüllproteinsequenzen stellte sich die Frage, ob die für die immunoelektronenmikroskopische Detektion verwendeten Immunglobuline diese verkürzten Proteine bzw. die dadurch eventuell gebildeten VLPs hinreichend erkennen konnten, da mit den Deletionen auch zahlreiche für die Antigen/Antikörperbindung wichtige Epitope verloren gegangen sein könnten.

Darüberhinaus konnte aufgrund der Beschaffenheit des pPVX P2A-Expressionssystems nicht dafür garantiert werden, daß die Unfähigkeit zur VLP-Bildung allein auf die in das TRV ON-Hüllprotein eingeführten Veränderungen zurückzuführen war oder ob das systembedingte Vorhandensein des P2A-Oligopeptids am C-Terminus des TRV ON-Hüllproteins eventuell einen zusätzlichen Einfluß hierauf ausübte.

Um diese Fragestellungen klären zu können, wurden ausgewählte TRV ON-Hüllproteinsequenzen in *E. coli* exprimiert. Die gebildeten Hüllproteine wurden zum einen für einen Nachweis der Bindungsfähigkeit der TRV ON-Immunglobuline an verkürzte TRV ON-Hüllproteine verwendet und zum anderen durch eine immunoelektronenmikroskopische Analyse auf ihre Fähigkeit zur VLP-Bildung hin untersucht.

#### **4.2.1.3. Expression von TRV ON-Hüllprotein in *E. coli***

Für die Expression wurden gezielt einige der bereits über das pPVX P2A-System exprimierten TRV ON-Hüllproteinsequenzen ausgewählt. Neben dem ganzlängigen Hüllprotein handelte sich hierbei um verschieden veränderte Sequenzen, die nach Expression über das pPVX P2A-System nicht zur VLP-Bildung in der Lage zu sein schienen. Zusätzlich wurde eine bisher nicht untersuchte sowohl N- als auch C-terminal extrem verkürzte Variante neu erstellt, um den Nachweis der IgG-Bindungsfähigkeit hinreichend absichern zu können. Alle Sequenzen trugen im Gegensatz zu den über das pPVX P2A-System exprimierten Hüllproteinen keine zusätzlichen Aminosäuren an N- oder C-Terminus, so daß die exprimierten Proteine ausschließlich aus TRV ON-Hüllprotein-eigenen Aminosäuren bestanden.

Die kodierenden Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe der in Tab. 28 angegebenen Primerkombinationen unter Verwendung von TRV ON-cDNA amplifiziert und über NdeI/BamHI in den Expressionsvektor pSBET b einkloniert.

Tab. 28: Beschreibung der pSBET b-Konstrukte mit verschiedenen verkürzten und mutierten TRV ON-Hüllproteingen-Sequenzen

pSBET b mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
<b>ON cp 1-210</b>	ON cp 12/ON cp 14	ganzlängiges TRV ON-Hüllprotein
<b>ON cp 5-210 Y®R</b>	ON cp 23/ON cp 14	N-terminal um 4 AS verkürzt; mit Tyrosin (Y <sub>5</sub> ) zu Arginin (R)
<b>ON cp 6-210</b>	ON cp 24/ON cp 14	N-terminal um 5 AS verkürzt
<b>ON cp 1-181 E®R</b>	ON cp 12/ON cp 22	C-terminal um 29 AS verkürzt; mit Glutaminsäure (E <sub>174</sub> ) zu Arginin (R)
<b>ON cp 1-178</b>	ON cp 12/ON cp 21	C-terminal um 32 AS verkürzt
<b>ON cp 6-178</b>	ON cp 24/ON cp 21	N- und C-terminal um 5 bzw. 32 AS verkürzt

Die Konstrukte wurden in den *E. coli*-Expressionsstamm BL 21 (DE3) transformiert und wie unter B 3.4. beschrieben zur Expression gebracht. Die exprimierten Proteine wurden zum einen für eine Western-Analyse vorbereitet und zum anderen einer Behandlung zur Aufreinigung von virusähnlichen Partikeln unterzogen.

#### a) Western-Analyse der in *E. coli* exprimierten TRV ON-Hüllproteine



Abb. 36:  
Immunoblot einer Western-Analyse verschiedener in *E. coli* exprimierter TRV ON-Hüllproteine  
Nachweis mit TRV ON-spezifischem IgG  
aufgetragenen Menge: 5 µl Probe  
**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder  
**1:** TRV ON cp-Positivkontrolle; **2:** ON cp 1-210;  
**3:** ON cp 5-210 Y→R; **4:** ON cp 6-210; **5:** ON cp 1-181 E→R; **6:** ON cp 1-178; **7:** ON cp 6-178

in <i>E. coli</i> exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa
<b>ON cp 1-210</b>	22.5
<b>ON cp 5-210 Y®R</b>	22.1
<b>ON cp 6-210</b>	22.0
<b>ON cp 1-181 E®R</b>	20.2
<b>ON cp 1-178</b>	19.7
<b>ON cp 6-178</b>	19.2
<b>TRV ON-Positivkontrolle</b>	22.5

Tab. 29:  
Molekulargewichte der verschiedenen in *E. coli* exprimierten Hüllproteine

Die Western-Analyse zeigte, daß in allen Proben TRV ON-Hüllprotein mit dem erwartetem Molekulargewicht nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 36 und Tab. 29). Die Expression in *E. coli* war damit in allen Fällen erfolgreich.

## b) Nachweis der Bindungsfähigkeit der TRV ON-Immunglobuline an verkürzte TRV ON-Hüllproteine

Soll mit Hilfe eines serologischen Systems ein Protein oder ein Proteinkomplex nachgewiesen werden, das durch Deletionen oder Mutationen einen Teil der antigenen Komponenten verloren hat, so stellt sich die Frage, ob die zum Nachweis verwendeten Antikörper dennoch in der Lage sind, das veränderte Antigen zu detektieren. Solange eine Detektion erfolgreich ist, spielt diese Fragestellung keine Rolle. Sobald aber das veränderte Antigen nicht mehr nachgewiesen werden kann, kann nicht ohne weiteres davon ausgegangen werden, daß es tatsächlich nicht vorhanden ist. Vielmehr muß gleichzeitig in Betracht gezogen werden, daß es lediglich durch das serologische System nicht mehr detektiert werden kann.

Eben dieses Problem stellte sich auch im Fall der hier durch Immunelektronenmikroskopie untersuchten VLP-Bildung durch verkürzte und mutierte TRV ON-Hüllproteine. Wie in einer von Legorburu et al. (1996) durchgeführten Pepscan-Analyse eines gegen das TRV-Isolat PLB gerichteten polyklonalen Antiserums gezeigt werden konnte, liegen die immunogenen Determinanten in erster Linie am C-Terminus des TRV PLB-Hüllproteins (vgl. Abb. 37). Daneben sind noch weitere Epitope im N-terminalen sowie im mittleren Bereich zu finden.

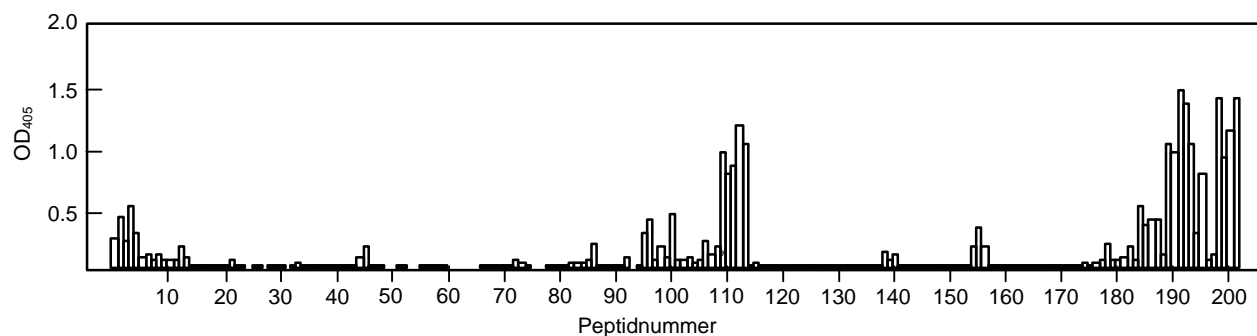


Abb. 37: Pepscan-Analyse eines gegen das TRV-Isolat PLB gerichteten polyklonalen Antiserums aus Kaninchen (nach Legorburu et al., 1996)

Geht man davon aus, daß sich diese Erkenntnisse im wesentlichen auch auf das hier verwendete TRV-Isolat ON übertragen lassen, so wurden durch die Deletionen am N- bzw. am C-Terminus zum großen Teil eben die Bereiche des TRV ON-Hüllproteins entfernt, die für die serologische Detektion erforderlich sind. Folglich konnte ein zuverlässiger Nachweis der VLP-Bildung durch diese verkürzten Hüllproteine mit Hilfe einer immunelektronenmikroskopischen Methode nicht zwangsläufig gewährleistet sein.

Da dieses Verfahren zur Anreicherung der häufig nur in geringer Anzahl vorliegenden TRV-ON-Aggregate dennoch unbedingt notwendig war, wurde in den nachfolgenden Untersuchungen geprüft, ob sich die verwendeten TRV ON-Immunglobuline tatsächlich zum Nachweis von möglicherweise aus verkürztem TRV ON-Hüllprotein gebildeten VLPs eigneten.

Daß außerhalb der von den Deletionen betroffenen immunodominanten Bereiche an N- und C-Terminus ausreichend andere Epitope zur Antikörperbindung in den verkürzten Hüllproteinen vorhanden waren, zeigten die verschiedenen Western-Analysen, in denen sich sämtliche Hüllproteinsequenzen ohne Probleme nachweisen ließen. Allerdings konnte diese Erkenntnis nicht ohne weiteres auf die Detektion von VLPs übertragen werden, da die nach außen hin präsentierten Epitope der zum VLP aggregierten Hüllproteine gänzlich andere sein können, als die in der Western-Analyse erkannten.

Der Nachweis, daß die im Western-Blot spezifisch an die Epitope eines verkürzten Hüllproteins gebundenen Antikörper außerdem dazu fähig waren, TRV ON-Partikel zu erkennen, erfolgte nach einem von Rybicki (1986) beschriebenen Protokoll zur Affinitätsreinigung spezifisch gebundener Antikörper.

Als Ausgangsmaterial dienten hierfür zum einen das über *E. coli* exprimierte ganzlängige TRV ON-Hüllprotein und zum anderen die ebenfalls über *E. coli* gebildete stark verkürzte Hüllproteinvariante ON cp 6-178 (vgl. C 4.2.1.3., Tab. 28). Aliquots der isolierten Proteine wurden wie unter B 3.7.7. beschrieben einer Western-Analyse unterzogen und die spezifisch gebundenen TRV ON-Antikörper abdissoziiert. Die so gewonnenen Antikörper wurden durch eine Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert und schließlich für die immunelektronenmikroskopische Detektion gewöhnlicher TRV ON-Partikel verwendet.

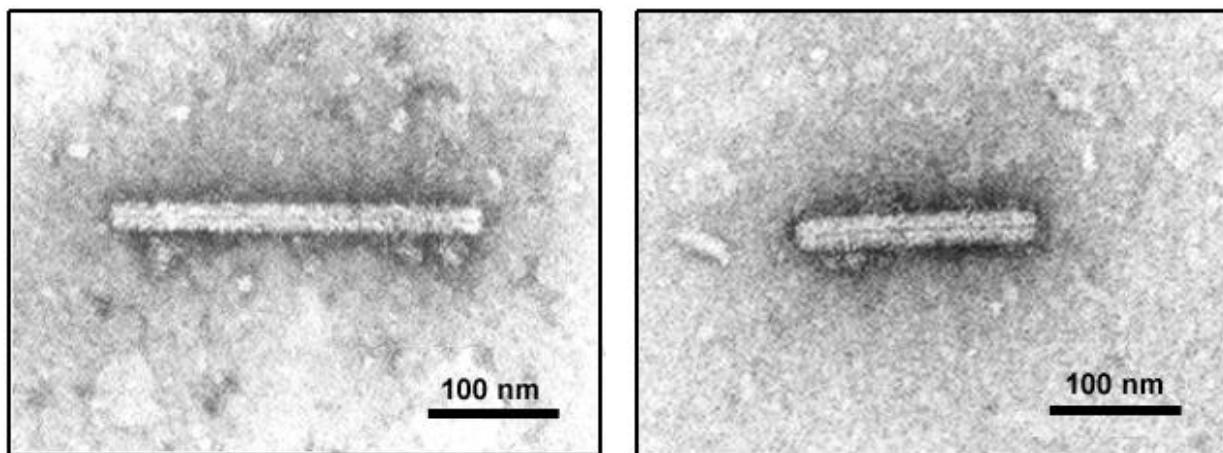


Abb. 38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit abdissoziierten TRV ON-Antikörpern getrappten und dekorierten TRV ON-Partikeln.

1: ISEM und Dekoration mit von ganzlängigem TRV ON-Hüllprotein abdissoziierten TRV ON-Antikörpern; 2: ISEM und Dekoration mit von N- und C-terminal verkürztem TRV ON-Hüllprotein ON cp 6-178 abdissoziierten TRV ON-Antikörpern

Im Elektronenmikroskop zeigte sich, daß sowohl die von den Epitopen des ganzlängigen TRV ON-Hüllproteins abdissoziierten TRV ON-Immunglobuline als auch die von der stark verkürzten Variante gewonnenen Antikörper dazu befähigt waren, die angebotenen TRV ON-Partikel zu detektieren (vgl. Abb. 38). Die Dekoration der Partikel mit diesen Antikörpern fiel zwar sehr schwach aus, da die Konzentration der verwendeten Antikörperlösungen extrem gering war, aber es waren in beiden Fällen deutlich einige gebundene Antikörper auf der Oberfläche der Partikel zu erkennen.

Da selbst an die stark verkürzte Hüllprotein-Variante ausreichend Immunglobuline binden konnten, konnte davon ausgegangen werden, daß auch auf den eventuell durch die verschiedenen hier untersuchten Hüllproteine gebildeten VLPs genügend Epitope präsentiert wurden, die durch die verwendeten TRV ON-Immunglobuline erkannt werden konnten. Folglich wurden die durch die Immunelektronenmikroskopie gewonnenen Ergebnisse zur VLP-Bildungsfähigkeit verkürzter und mutierter TRV ON-Hüllproteine als verlässlich angesehen.

### c) Untersuchung der VLP-Bildung durch in *E. coli* exprimiertes TRV ON-Hüllprotein

Um sicherzustellen, daß die mit Hilfe des pPVX P2A-Systems ermittelten Erkenntnisse zur Aggregationsfähigkeit verkürzter und veränderter TRV ON-Hüllproteine nicht allein in diesem System gelten, sondern auch unter anderen Bedingungen reproduzierbar

sind, wurde die Fähigkeit zur VLP-Bildung zusätzlich in einem bakteriellen Expressionssystem getestet.

Für die Expression wurden die verschiedenen in Tab. 28 (C 4.2.1.3.) dargestellten TRV ON-Hüllproteinsequenzen verwendet. Wie bereits erwähnt, handelte es sich bei diesen Sequenzen neben dem ganzlängigen Hüllprotein ausschließlich um verkürzte und veränderte Varianten des TRV ON-Hüllproteins, bei denen im pPVX P2A-System keine Bildung von VLPs nachgewiesen werden konnte. Die im bakteriellen System exprimierten Hüllproteine bestanden ausschließlich aus TRV ON cp-eigenen Aminosäuren. Zusätzliche C-terminale Sequenzen wie das P2A-Oligopeptid fehlten. Somit sollte ermittelt werden, ob sich die im pPVX P2A-System gemachten Beobachtungen auch auf die über das bakterielle System erzeugten Hüllproteine übertragen ließen. Gleichzeitig bot dies die Möglichkeit, eventuell durch die zusätzliche C-terminale P2A-Sequenz ausgelöste Artefakte in Bezug auf die VLP-Bildungsfähigkeit der über pPVX P2A exprimierten Hüllproteine aufzudecken.

Dazu wurden die eventuell durch diese Proteine gebildeten VLPs im Anschluß an die Expression in *E. coli* nach dem unter B 3.4.3. beschriebenen Protokoll aufgereinigt. Die gereinigten Extrakte wurden darauf im ISEM untersucht.

Tab. 30: Ergebnisse der immunelektronenmikroskopischen Untersuchung auf Bildung von VLPs durch in *E. coli* exprimierte Hüllproteinsequenzen im Vergleich mit der Bildung von VLPs durch entsprechende über pPVX P2A exprimierte TRV ON-Hüllproteine

exprimiertes Hüllprotein	VLP-Bildung durch	
	in <i>E. coli</i> exprimiertes Hüllprotein	über pPVX P2A Ascl exprimiertes Hüllprotein
ON cp 1-210	+	+
ON cp 5-210 Y® R	-	-
ON cp 6-210	-	-
ON cp 1-181 E® R	-	-
ON cp 1-178	-	-

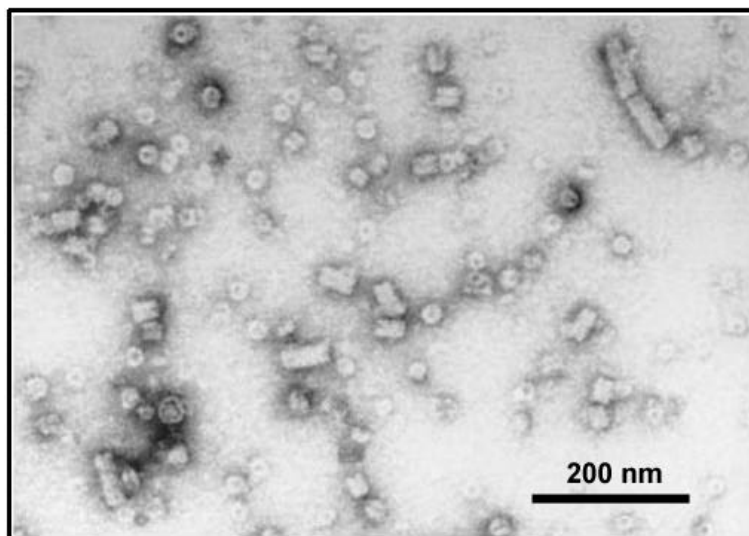


Abb. 39: Immunelektronenmikroskopische Aufnahme von VLPs, gebildet durch in *E. coli* exprimierte ganzlängige TRV ON-Hüllproteine. ISEM mit TRV ON-spezifischem Antikörper

Die in Tab. 30 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß lediglich im Falle des ganzlängigen Hüllproteins eine Bildung von VLPs zu beobachten war (vgl. auch Abb. 39). Die übrigen verkürzten und veränderten Hüllproteine schienen keine virusähnlichen Aggregate bilden zu können.



Das bakterielle System lieferte damit die gleichen Ergebnisse wie das pPVX P2A-System. Die hierdurch gewonnenen Erkenntnisse waren folglich durchaus auch unter anderen Expressionsbedingungen reproduzierbar. Zudem machten diese Ergebnisse deutlich, daß das bei den über pPVX P2A Ascl exprimierten Hüllproteinen C-terminal anhängende P2A-Oligopeptid keinen nachweislichen Einfluß auf die VLP-Bildungsfähigkeit zu haben schien. Die beobachteten Effekte waren daher auf die vorgenommenen Veränderungen der TRV ORY-Hüllproteinsequenz zurückzuführen.

#### 4.2.2. Bildung virusähnlicher Partikel durch verkürzte Sequenzen des TRV ORY-Hüllproteins

Für die Amplifikation der verschieden verkürzten Formen des TRV ORY-Hüllproteins wurde cDNA des TRV ORY-Isolats als Matrizen-DNA mit den in Tab. 31 angegebenen Primerkombinationen verwendet. Folgende Konstrukte wurden erstellt:

Tab. 31: Beschreibung der pPVX P2A-Konstrukte mit verschieden verkürzten TRV ORY-Hüllproteingen-Sequenzen

pPVX P2A Ascl mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
<b>ORY cp 5-201</b>	ORY cp 3/ORY cp 2	N-terminal um 4 AS verkürzt
<b>ORY cp 1-186</b>	ORY cp 1/ORY cp 4	C-terminal um 15 AS verkürzt
<b>ORY cp 5-186</b>	ORY cp 3/ORY cp 4	N- und C-terminal um 4 bzw. 15 AS verkürzt

##### 4.2.2.1. Virusnachweis im ELISA und immunoelektronenmikroskopische Untersuchung

In allen untersuchten Pflanzen konnten mittels ELISA PVX-Partikel detektiert werden. Alle Konstrukte erwiesen sich damit als infektiös.

Durch ISEM mit Dekorationstest unter Verwendung von TRV ORY-spezifischen Antikörpern wurden die Proben auf VLPs untersucht.

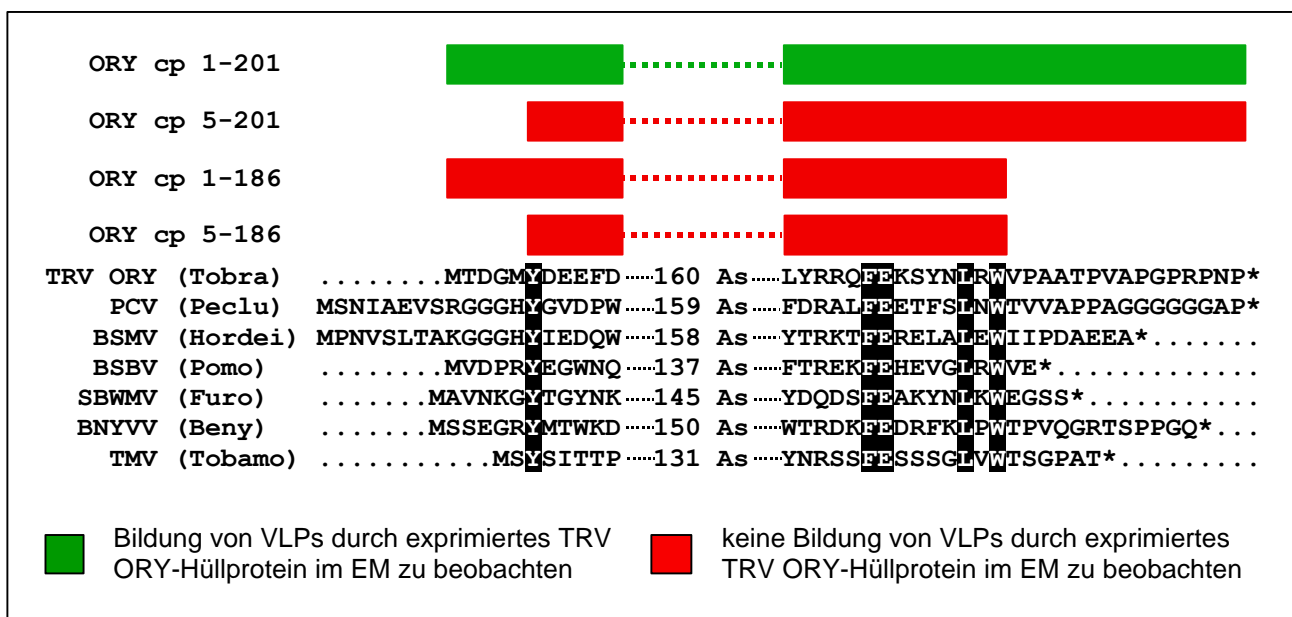


Abb. 40: Schematische Darstellung der VLP-Bildungsfähigkeit der über pPVX P2A Ascl exprimierten verschieden verkürzten TRV ORY-Hüllproteine.

Die Balken über dem Alignment der Hüllproteinsequenzen verschiedener Viren mit stäbchenförmigen Partikeln geben den exprimierten Bereich der TRV ORY-Hüllproteinsequenz an.



Anders als im Fall des TRV ON-Hüllproteins schien das Hüllprotein des TRV-Isolats ORY sehr viel weniger tolerant gegenüber Veränderungen seiner Sequenz zu sein. TRV-typische, stäbchenförmige VLPs wurden nur bei der Expression des ganzlängigen TRV ORY-Hüllproteins gebildet. Bei keiner der verkürzten Varianten konnten VLPs im EM detektiert werden (vgl. Abb. 40). Um auch hier ausschließen zu können, daß in den infizierten Pflanzen nicht genügend TRV ORY-Hüllprotein für eine Aggregation vorlag, wurden Gesamtproteinextrakte dieser Pflanzen hergestellt und in einer Western-Analyse untersucht.

#### 4.2.2.2. Western-Analyse der verschiedenen, über pPVX P2A Ascl exprimierten TRV ORY-Hüllproteinsequenzen

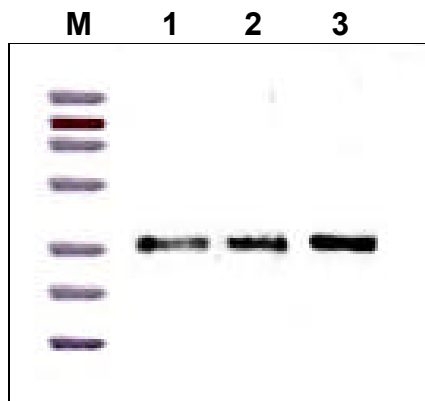


Abb. 41:

Immunoblot einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pPVX TRV ORY cp-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen

Nachweis des PVX-Hüllproteins mit PVX-spezifischem IgG aufgetragenen Menge: 1 µl des Gesamtproteinextrakts

**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder; **1:** pPVX ORY cp 5-201; **2:** pPVX ORY cp 1-186; **3:** pPVX ORY cp 5-186

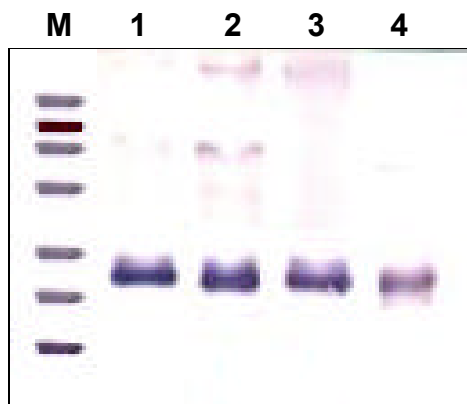


Abb. 42:

Immunoblot einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pPVX TRV ORY cp-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen

Nachweis des TRV ORY-Hüllproteins mit TRV ORY-spezifischem IgG aufgetragenen Menge: 10 µl des Gesamtproteinextrakts

**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder; **1:** pPVX ORY cp 5-201; **2:** pPVX ORY cp 1-186; **3:** pPVX ORY cp 5-186; **4:** TRV ORY-Positivkontrolle

über pPVX P2A Ascl exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa
<b>PVX cp</b>	25.1
<b>ORY cp 5-201</b>	23.6
<b>ORY cp 1-186</b>	22.6
<b>ORY cp 5-186</b>	22.2
<b>TRV ORY-Positivkontrolle</b>	22.4

Tab. 32:

Molekulargewichte der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten Hüllproteine

In der Western-Analyse konnte in allen Proben sowohl PVX- als auch TRV ORY-Hüllprotein nachgewiesen werden (vgl. Abb. 41 + 42). Die Laufstrecken aller detektierten Banden entsprachen dem für das jeweilige Protein erwarteten Molekulargewicht (vgl. Tab. 32). Auch hier war zu beachten, daß die über pPVX P2A

Ascl exprimierten TRV ORY- Hüllproteine aufgrund des ihnen anhängenden P2A-Oligopeptids ein um ~1.7 kDa größeres Molekulargewicht aufwiesen, als die reine TRV ORY-Hüllproteinsequenz.

Das ebenfalls bei der Expression über das pPVX P2A-System entstandene Fusionsprotein aus TRV ORY cp, P2A und PVX cp war hier als Bande bei ~48 kDa nur in einigen Proben sehr schwach zu erkennen.

Die Western-Analyse zeigte, daß theoretisch ausreichend TRV ORY-Hüllprotein in den infizierten Pflanzen vorlag, um eine Bildung von virusähnlichen Partikeln zu gewährleisten. Daß im Fall der verkürzten Varianten dennoch keine VLPs im EM zu beobachten waren, ist vermutlich auf die Unfähigkeit dieser Hüllproteine zur Aggregation zurückzuführen. Ob diese Unfähigkeit allerdings allein durch die vorgenommenen Verkürzungen oder aber zum Teil auch durch das anhängende P2A-Oligopeptid verursacht wurde, könnte nur durch eine vergleichende Studie in einem bakteriellen System ermittelt werden. Zusätzlich müßte - wie bei der Untersuchung der VLP-Bildungsfähigkeit des TRV ON-Hüllproteins - sichergestellt werden, daß das verwendete TRV ORY-spezifische Immunglobulin die eventuell durch die verkürzten Hüllproteine gebildeten VLPs detektieren konnte. Diesen Fragestellungen wurde allerdings im Hinblick auf die bereits für das TRV ON-Hüllprotein durchgeführten umfangreichen Untersuchungen und aufgrund beschränkter Kapazitäten nicht weiter nachgegangen.

#### 4.2.3. Bildung virusähnlicher Partikel durch verschieden verkürzte Sequenzen des PVY-Hüllproteins

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine verschiedener Potyviren offenbart eine besondere Eigenschaft dieser Virusgruppe (vgl. Abb. 43). Während der N-terminale Bereich der Hüllproteine extrem variabel in Länge und Sequenz ist, erweist sich der C-terminale Teil als hoch konserviert. Dieser als Core-Region bezeichnete Bereich umfaßt etwa drei Viertel des Gesamtproteins und weist eine Sequenzidentität von durchschnittlich 65% auf. Aufgrund des hohen Konservierungsgrads der Core-Region läßt sich vermuten, daß dieser Teil essentiell für die Funktion des Hüllproteins ist. Interessant ist es daher zu ermitteln, inwieweit Verkürzungen in diesem Bereich im Hinblick auf die Fähigkeit zur Bildung von VLPs toleriert werden oder ob lediglich eine Deletion des variablen N-Terminus geduldet wird. So wurden auf Grundlage des in Abb. 43 dargestellten Alignments der Hüllproteinsequenzen unterschiedlicher Potyviren verschiedene N- und C-terminale Verkürzungen am Hüllprotein des PVY vorgenommen.

PVY	1	.....GNDTIDAGSGTKKDAKQEQG
TEV	1	.....SGTVDAAGADAGKKKDQK
JGMV	1	.....SGNEDAGKQKSATPAANQTASGDGKPVQTTATADNKPSSDNTSNAQGTSQTKGGGES
LMV	1	.....VDAKLDAQGQSKTDDKQKNSADPKDNIITE
BYMV	1	.....SGKEAVENLDTQLNAGEEKKDKRKKNEGNPNKDS
CLYVV	1	.....DSQMKFVFQSDKEKLNAGEQQKFKDKEPRQRDQE
TuMV	1	.....ANETLDAGLTEEQQAEEKEREREKAEKERKRQQLALKK
PRSV	1	.....NEAVDAGLNEKLKEKEKQKEKEKQKEKEDNASDNGA
PPV	1	ADEREDEEEVDAGKPVVVTAPAATSPILQPPVPIQAPRTTAPMLNPIFTATTQPATKPVSVSGPQLQTFGTGYNEDASPS
SPFMV	1	.....SSERTEFKDAGANPPAPAPKNI PPPPTITEVTDPEDPKQAALKAARAKQPATIPESYGRDTSKEKES

PVY	21	SIQPNLNKEKEKDVNVGTS	SGTHTVPRIKAITSKMRMEKSKGATVLNLKHLLEYAPQOQIDISNTRATOSQFDTWYEAVALANDI
TEV	18	DDKVAEQASKDRDVNAGTSGTFSVPRINAMATKLOYPRMRGEVVVNLNHLGKYPQOQIDL SNARATHEQFAAHHQAVMTAMGV	
JGMV	58	GGTNATATKKQKDVVCGSTGTEVIEPKLKVSPKMRLEMVSNRAILNLDEHLIOYKPDORDISNARATHTQFQFWNRVKKEDV	
LMV	31	KGSGSGQMKKDDINAGLHGKHTIPRTKAITQKMKLEPMIRGRVALNLDEHLLYEYEPNORDISNTRATOKQYESWMDGVKNDMDV	
BYMV	35	EGQSVRQIVPDRDVNAGTVGTFSVPRLLKLIAGKLNIEKIGGKIVFNLDEHLLKYNBPQDDISNVIATQFQFEAWNGVKQAMEV	
CLYVV	35	GENSNRQIIPDRDINAGTGTFSVPKLKKISGKLSLEPKIKGGLNLDEHLLVYVNPQDDISNNIATQFQLEAWHEGVKSAMEV	
TuMV	41	GKNSQEEGERDKEVNAGTSGTFSVPRLLKSLTSKMRVPEKYEKRVALNLDEHLLIYTPBOTDLSNTRSTOKQENTWIEGVMDYEL	
PRSV	38	ESTSTKTGERDRDVNVGTS	SGSFTVPRIKSFTDKMVLPRIKGKTVLNLNHLLOYNPQOQIDISNTRATOSQFEKWNIEGVNRNDYGL
PPV	84	NSNALVNTNRDRDVDA	CSIGTEVPRLLKAMTSKLSLEPKVKGAIMNLNHLAHYSPAQVDLSNTRAPQSCFQFTWYEGVKKRDMDV
SPFMV	68	IVGASSKGARDKDVNVGTVGTFSVPRVMNANKKRPQPMVNGRAIINFOHLSTYEPQFEVANTRSTQFQFQAWYEGVKGDMGV	

Abb. 43: Fortsetzung siehe nächste Seite

PVY 104 GETEMPTVMNGLMVWCIENGTS PNINGVWVMMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGL  
 TEV 101 NEEQMKILNGLMVWCIENGTS PNINGVWVMMDGDEQVSYPLKPMVENAOPTLRQIMTHFSDLAEEAYIEMRNRRPYMPRYGL  
 JGMV 141 DDEQMRILNGLMVWCIENGTS PDINGVWVMMDGNNQSEFPLKPIVENAKPTLRQCMHFSDAAEAYIEMRNLDPEYMPRYGL  
 LMV 114 DDSGMOLILNGLMVWCIENGTS PNINGVWVMMDGDEQVEYALKPIIEHAKPTFRQIMAHFSDAAEAYIEMRNKKKPYMPRYGR  
 BYMV 118 EDSRMGIILNGLMVWCIENGTS GDLOGKVTMMDGDEQVITYPLKPIILDNAKPTFRQIMSHFSQVAEAYIEKRNNATERYMPRYGL  
 CLYVV 118 DDQOMETIICNGLMVWCIENGTS GDLOGKVTMMDGDEQVITYPLKPIILDFAKPTLRQIMAHFSQAAESYIEFRNSTERYMPRYGL  
 TuMV 124 TEDKMOIILNGLMVWCIENGTS PNINGVWVMMDGDDOVELPIKPLIDHAKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEKRNNQDRPYMPRYGL  
 PRSV 121 NDNEQVMNGLMVWCIENGTS PDLSGVWVMMDGDETQVDYPIKPLIEHATPSFRQIMAHLSNAAEAYIAKRNNATEKYMPRYGI  
 PPV 167 TDDMSIILNGLMVWCIENGTS PNINGVWVMMDGDETQVEYPIKPLLDHAKPTFRQIMAHFSNVAEAYIEKRNNYEKAYMPRYGI  
 SPMV 151 DDTGMCILNGLMVWCIENGTS PNINGVWVMMDGDEQVITYPIKPLLDHAKPTFRQIMTHFSDVAEAYIEMRNRTKAYMPRYGL

PVY 187 VRNLRDGSRLARYAFDFYEVTSRTFVRAREAHIQMKAAALKSAQSRLFGLDGGISTOEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKMN.  
 TEV 184 QRNLTDMSLSRYAFDFYELTSKTFVRAREAHMQKAAAVRNSGTRLEGLDGNVGTAEEDTERHTAHADVNRNMHTLLGVRO..  
 JGMV 224 LRNLNDKSLARYAFDFYELTSRTFVRAREAHQAOMKAAAIRGSTNHMFGLDGNVCESSETERHTAADVSRNVHSYRCAKI..  
 LMV 197 LRNLNDMGLARYAFDFYELTSATFVRAREAHNQMKAAALVGTONRLEGLDGGGSTOEENTERHTAADVNQNMHTLLGVRLH  
 BYMV 201 QRNLTDYGLARYAFDFYELTSKTFVRAREAHMQKAAAVRGRNRLFGLDGNVGTDEENTERHTAGDVNRDMHTMLGVRI..  
 CLYVV 201 QRNLTDYGLARYAFDFYELTSKTFVRAREAHMQKAAAIRGKSNHMFGLDGNVGTDEENTERHTANDVNRRNMHTLLGVRLH  
 TuMV 207 QRNLTDMSLSRYAFDFYELTSRTFVRAREAHIQMKAAALRGANNLEGLDGNVGTDEENTERHTEDVNRRNMHTLLGVQGL..  
 PRSV 204 KRNLTDISLARYAFDFYELTSKTFVRAREAHMQKAAALRNTNRMCMDGSSVSNKEENTERHTEDVNRRNMHTLLGVQGL..  
 PPV 250 QRNLTDYSLARYAFDFYELTSRTFVRAREAHIQMKAAALRVQNRRLFGLDGNVGTDEEDTERHTAGDVNRNMHTLLGVQGL..  
 SPMV 234 QRNLTDMSLSRYAFDFYELHSTFVRAREAHLMKAAALKNAKRNRLFGLDGNVGTDEEDTERHTTTDVTRNHTNLLGMRGVQ

Abb. 43: Vergleich der Aminosäuresequenz der Hüllproteine verschiedener Potyviren.  
 Die in allen Sequenzen vorkommenden Aminosäuren sind schwarz unterlegt.  
 Aminosäuren, die in mehr als der Hälfte der Sequenzen auftreten, sind grau unterlegt.

Für die Amplifikation der verschiedenen verkürzten Formen des PVY-Hüllproteins wurde cDNA des PVY-Isolats als Matrizen-DNA mit den in Tab. 33 angegebenen Primerkombinationen verwendet. Folgende Konstrukte wurden erstellt:

Tab. 33: Beschreibung der pPVX-Konstrukte mit verschiedenen verkürzten PVY-Hüllproteingen-Sequenzen

pPVX P2A Ascl mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
<b>py cp 11-267</b>	py cp 4/py cp 2	N-terminal um 10 AS verkürzt
<b>py cp 21-267</b>	py cp 5/py cp 2	N-terminal um 20 AS verkürzt
<b>py cp 30-267</b>	py cp 6/py cp 2	N-terminal um 29 AS verkürzt
<b>py cp 33-267</b>	py cp 7/py cp 2	N-terminal um 32 AS verkürzt
<b>py cp 35-267</b>	py cp 8/py cp 2	N-terminal um 34 AS verkürzt
<b>py cp 40-267</b>	py cp 9/py cp 2	N-terminal um 39 AS verkürzt
<b>py cp 41-267</b>	py cp 12/py cp 2	N-terminal um 40 AS verkürzt
<b>py cp 46-267</b>	py cp 13/py cp 2	N-terminal um 45 AS verkürzt
<b>py cp 54-267</b>	py cp 14/py cp 2	N-terminal um 53 AS verkürzt

<b>py cp 1-245</b>	py cp 3/py cp 11	C-terminal um 22 AS verkürzt
<b>py cp 1-244</b>	py cp 3/py cp 17	C-terminal um 23 AS verkürzt
<b>py cp 1-243</b>	py cp 3/py cp 18	C-terminal um 24 AS verkürzt
<b>py cp 1-242</b>	py cp 3/py cp 19	C-terminal um 25 AS verkürzt
<b>py cp 1-241</b>	py cp 3/py cp 20	C-terminal um 26 AS verkürzt
<b>py cp 1-240</b>	py cp 3/py cp 21	C-terminal um 27 AS verkürzt
<b>py cp 1-239</b>	py cp 3/py cp 22	C-terminal um 28 AS verkürzt
<b>py cp 1-238</b>	py cp 3/py cp 23	C-terminal um 29 AS verkürzt
<b>py cp 1-237</b>	py cp 3/py cp 15	C-terminal um 30 AS verkürzt
<b>py cp 1-232</b>	py cp 3/py cp 16	C-terminal um 35 AS verkürzt

#### 4.2.3.1. Virusnachweis im ELISA und immunoelektronenmikroskopische Untersuchung

In allen untersuchten Pflanzen konnten mittels ELISA PVX-Partikel detektiert werden. Alle Konstrukte waren damit infektiös.

Infiziertes Blattmaterial wurde einem ISEM mit Dekorationstest unter Verwendung von PVY-spezifischen Antikörpern unterzogen.

Bei sukzessiver Verkürzung des N-terminalen Bereichs des PVY-Hüllproteins konnten die in Abb. 44 dargestellten Beobachtungen gemacht werden.

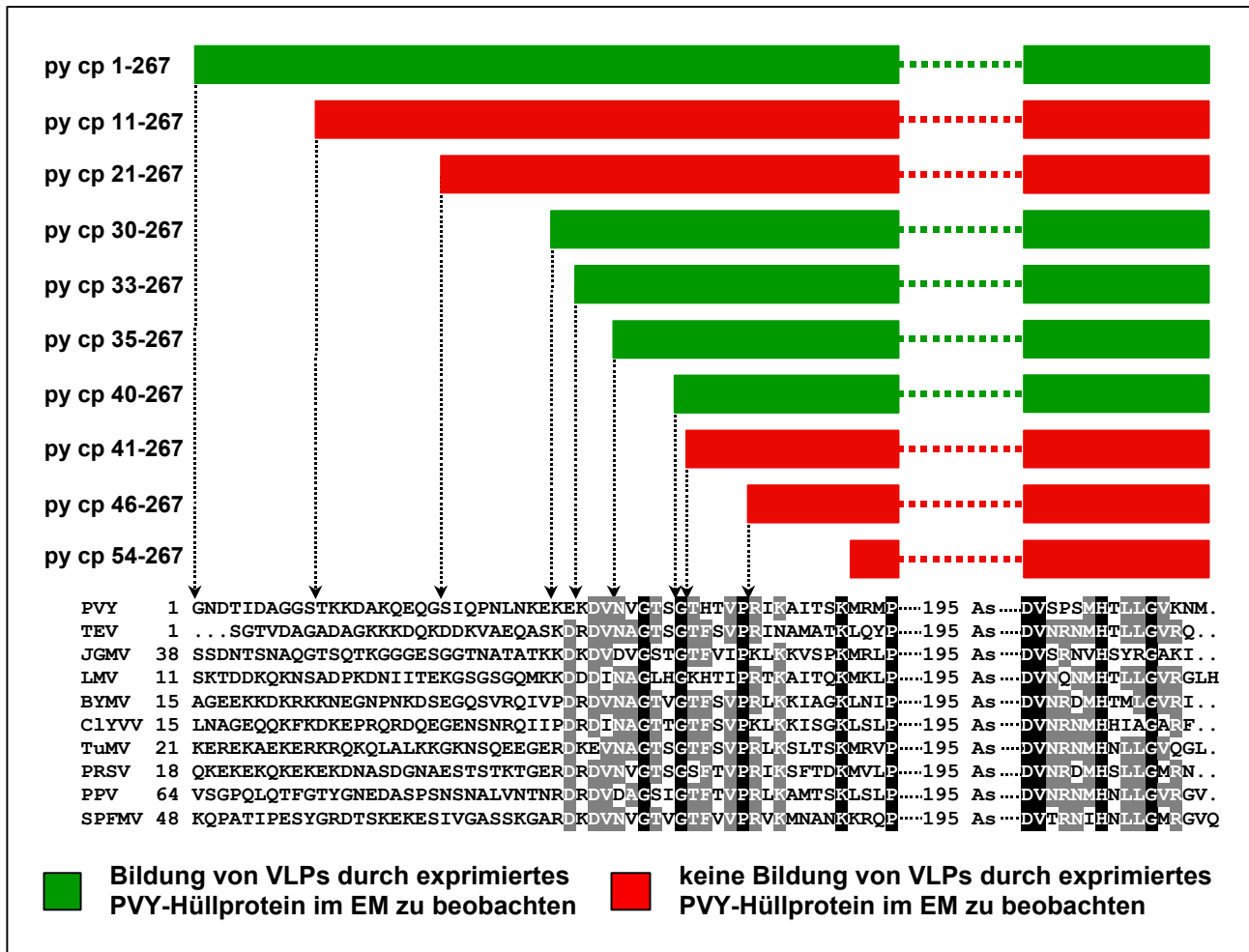


Abb. 44: Schematische Darstellung der VLP-Bildungsfähigkeit der über pPVX P2A AscI exprimierten, N-terminal verkürzten PVY-Hüllproteine. Die Balken über dem Alignment der Hüllproteinsequenzen verschiedener Potyviren geben den Bereich der exprimierten PVY-Hüllproteinsequenz an.

Eine N-terminale Verkürzung um bis zu 39 Aminosäuren blieb ohne Einfluß auf die Fähigkeit zur VLP-Bildung. Wurden weitere Aminosäuren entfernt, konnten im Elektronenmikroskop keine PVY-ähnlichen Partikel mehr detektiert werden. Da der konservierte Bereich bereits bei AS 33 beginnt, wurde somit nicht nur eine vollständige Deletion des variablen Teils, sondern auch das Fehlen der ersten 7 Aminosäuren der Core-Region toleriert.

Überraschenderweise konnten bei zwei Konstrukten im variablen Bereich (py cp 11-267 und py cp 21-267) ebenfalls keine PVY-ähnlichen Partikel nachgewiesen werden, obschon bei stärkerer Verkürzung wiederum VLPs zu beobachten waren. Eine

Western-Analyse ergab, daß das Ausbleiben der VLP-Bildung tatsächlich auf die Unfähigkeit zur Aggregation zurückzuführen war und nicht auf ein Fehlen des jeweiligen Hüllproteins (vgl. C 4.2.3.2.).

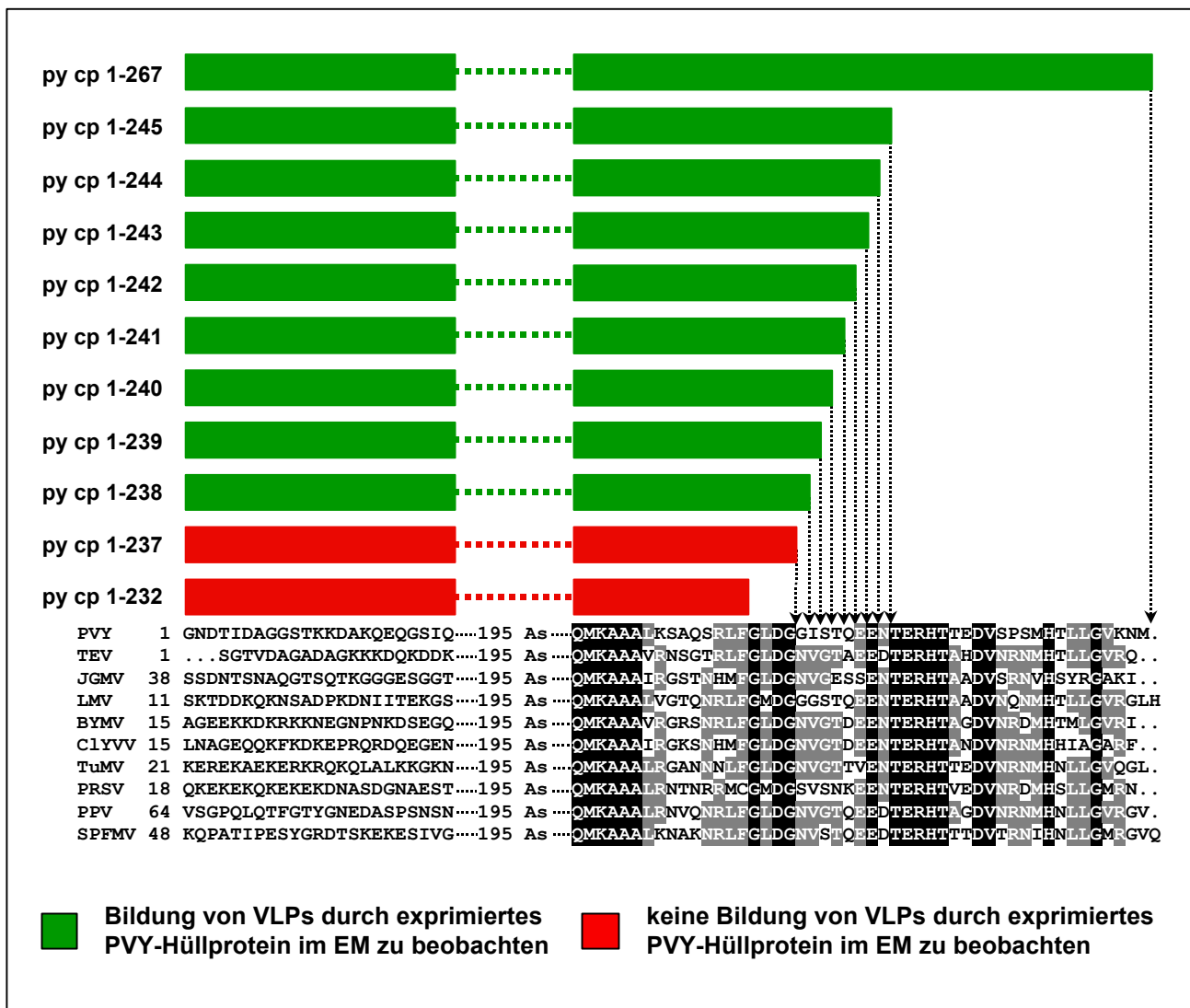


Abb. 45: Schematische Darstellung der VLP-Bildungsfähigkeit der über pPVX P2A Ascl exprimierten, C-terminal verkürzten PVY-Hüllproteine.

Die Balken über dem Alignment der Hüllproteinsequenzen verschiedener Potyviren geben den Bereich der exprimierten PVY-Hüllproteinsequenz an.

Während im N-terminalen Bereich der Core-Region lediglich der Verlust einiger weniger Aminosäuren toleriert wurde, konnte am C-Terminus eine weit größere Anzahl an Aminosäuren entfernt werden, ohne die Fähigkeit zur VLP-Bildung zu beeinflussen (vgl. Abb. 45). Selbst ein um 29 Aminosäuren verkürztes PVY-Hüllprotein war noch in der Lage, PVY-ähnliche Partikel zu bilden. Wurden allerdings mehr als 29 Aminosäuren entfernt, konnten keine VLPs mehr beobachtet werden.

Um sichergehen zu können, daß auch in den Pflanzen, in denen keine PVY-ähnlichen Partikel detektiert werden konnten, ausreichend Hüllprotein zur Verfügung stand, wurden Proteinextrakte sämtlicher Pflanzen einer Western-Analyse unterzogen.

#### 4.2.3.2. Western-Analyse der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten PVY-Hüllproteinsequenzen

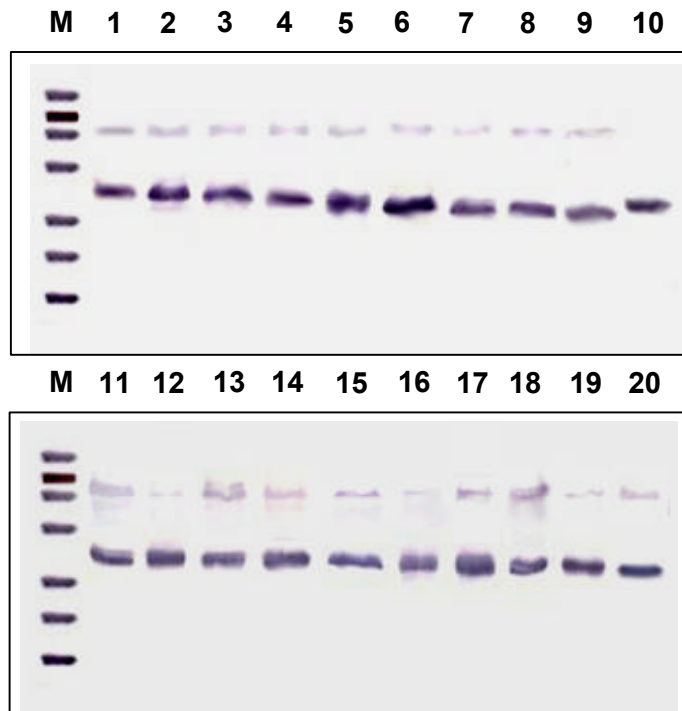


Abb. 46:

Immunoblots einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pPVX py cp-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen

Nachweis des PVY-Hüllproteins mit PVY-spezifischem IgG

aufgetragene Menge: 5 µl des Gesamtprotein-extrakts

**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder; **1:** py cp 11-267; **2:** py cp 21-267; **3:** py cp 30-267; **4:** py cp 33-267; **5:** py cp 35-267; **6:** py cp 40-267; **7:** py cp 41-267; **8:** py cp 46-267; **9:** py cp 54-267; **10:** PVY-Positivkontrolle; **11:** py cp 1-245; **12:** py cp 1-244; **13:** py cp 1-243; **14:** py cp 1-242; **15:** py cp 1-241; **16:** py cp 1-240; **17:** py cp 1-239; **18:** py cp 1-238; **19:** py cp 1-237; **20:** py cp 1-232

Tab. 34: Molekulargewichte der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten PVY-Hüllproteine

über pPVX P2A Ascl exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa	über pPVX P2A Ascl exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa
py cp 11-267	30.70	py cp 1-245	29.12
py cp 21-267	29.58	py cp 1-244	29.01
py cp 30-267	28.56	py cp 1-243	28.88
py cp 33-267	28.17	py cp 1-242	28.75
py cp 35-267	27.96	py cp 1-241	28.62
py cp 40-267	27.50	py cp 1-240	28.52
py cp 41-267	27.44	py cp 1-239	28.43
py cp 46-267	26.91	py cp 1-238	28.32
py cp 54-267	25.49	py cp 1-237	28.26
PVY-Positivkontrolle	29.90	py cp 1-232	27.77

Mit Hilfe der Western-Analyse konnte in allen infizierten Pflanzen PVY-Hüllprotein nachgewiesen werden (vgl. Abb. 46). Die höhere molekulare Masse der verschiedenen verkürzten PVY-Hüllproteine im Vergleich zu der ganzlängigen PVY-Hüllprotein-Positivkontrolle lag in der den über das pPVX P2A-System exprimierten Hüllproteinen anhängenden P2A-Sequenz begründet, die im Falle des aus mit herkömmlichem PVY infizierten Pflanzen extrahierten nativen PVY-Hüllproteins natürlich fehlten.

Neben der PVY-Hüllprotein-Bande trat auch hier eine zusätzliche schwache Bande bei ca. 50-53 kDa auf, welche das in geringen Mengen vorkommende Fusionsprotein aus PVY-Hüllprotein, P2A und PVX-Hüllprotein darstellte.

Die Ergebnisse der Western-Analyse stellten sicher, daß in allen Fällen ausreichend Protein zur Verfügung stand und ein Ausbleiben der Bildung von VLPs auf die Unfähigkeit der jeweiligen verkürzten Hüllproteine zur Aggregation zurückzuführen war.

#### 4.2.3.3. Expression von PVY-Hüllprotein in *E. coli*

Wie bereits für das TRV ON-Hüllprotein sollte auch für das PVY-Hüllprotein untersucht werden, ob sich die über das pPVX P2A-System gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf die Aggregationsfähigkeit verkürzter Hüllproteine in einem bakteriellen System reproduzieren ließen.

Für die Expression in Bakterien wurden neben dem ganzlängigen PVY-Hüllprotein als Positivkontrolle PVY-Sequenzen gewählt, die nach N- bzw. C-terminaler Verkürzung gerade noch bzw. gerade nicht mehr zu VLPs aggregierten. Diese verkürzten Sequenzen wurden sowohl mit als auch ohne anhängendes P2A eingesetzt, um einen möglichen Effekt des P2A-Oligopeptids untersuchen zu können.

Zur Amplifikation der verschiedenen kodierenden Sequenzen wurden die in Tab. 35 angegebenen Primerkombinationen verwendet. Als Matrizen-DNA für die Varianten ohne P2A-Gensequenz diente das in pGEM-T klonierte ganzlängige PVY-Hüllprotein-Gen, während für die Varianten mit P2A-Gensequenz die pPVX P2A-Konstrukte genutzt wurden, die bereits das entsprechend verkürzte PVY-Hüllproteingen tragen (vgl. C 4.2.3., Tab. 33). Folgende Konstrukte wurden nach diesem Prinzip erstellt:

Tab. 35: Beschreibung der pSBET b-Konstrukte mit verschiedenen verkürzten PVY-Hüllproteingen-Sequenzen mit und ohne P2A-Gensequenz

pSBET b mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
<b>py cp 1-267</b>	py cp 24/py cp 25	ganzlängiges PVY-Hüllprotein
<b>py cp 40-267</b>	py cp 28/py cp 25	N-terminal um 39 AS verkürzt
<b>py cp 41-267</b>	py cp 29/py cp 25	N-terminal um 40 AS verkürzt
<b>py cp 1-238</b>	py cp 24/py cp 26	C-terminal um 29 AS verkürzt
<b>py cp 1-237</b>	py cp 24/py cp 27	C-terminal um 30 AS verkürzt
<b>py cp 40-267 P2A</b>	py cp 28/P2A 1	N-terminal um 39 AS verkürzt; mit P2A
<b>py cp 41-267 P2A</b>	py cp 29/P2A 1	N-terminal um 40 AS verkürzt; mit P2A
<b>py cp 1-238 P2A</b>	py cp 24/P2A 1	C-terminal um 29 AS verkürzt; mit P2A
<b>py cp 1-237 P2A</b>	py cp 24/P2A 1	C-terminal um 30 AS verkürzt; mit P2A

Die Konstrukte wurden in den *E. coli*-Expressionsstamm BL 21 (DE3) transformiert und wie unter B 3.4. beschrieben zur Expression gebracht. Die exprimierten Proteine wurden sowohl für eine Analyse im Western Blot vorbereitet als auch einer Behandlung zur Aufreinigung von virusähnlichen Partikeln unterzogen.

#### a) Western-Analyse der in *E. coli* exprimierten PVY-Hüllproteine

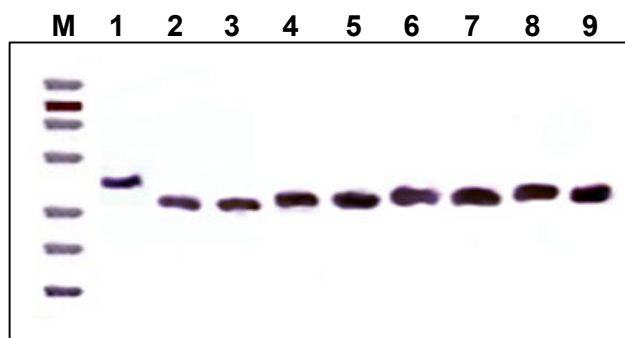


Abb. 47:  
Immunoblot einer Western-Analyse verschiedener in *E. coli* exprimierter PVY-Hüllproteine  
Nachweis mit PVY-spezifischem IgG  
aufgetragene Menge: 3 µl Probe  
**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder;  
**1:** py cp 1-267; **2:** py cp 40-267; **3:** py cp 41-267;  
**4:** py cp 1-238; **5:** py cp 1-237; **6:** py cp 40-267 P2A; **7:** py cp 41-267 P2A; **8:** py cp 1-238 P2A; **9:** py cp 1-237 P2A



über pSBET b exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa ohne P2A	Molekulargewicht in kDa mit P2A
py cp 1-267	29.90	–
py cp 40-267	25.81	27.50
py cp 41-267	25.75	27.44
py cp 1-238	26.63	28.32
py cp 1-237	26.57	28.26

Tab. 36:  
Molekulargewichte der verschiedenen in *E. coli* exprimierten PVY-Hüllproteine

Der in Abb. 47 dargestellte Immunoblot zeigt, daß in allen Proben PVY-Hüllprotein mit erwartetem Molekulargewicht nachgewiesen werden konnte (vgl. auch Tab. 36). Somit müsste in jedem Expressionsansatz ausreichend Protein gebildet worden sein, um eine Aggregation zu VLPs zu ermöglichen.

#### b) Untersuchung der VLP-Bildung durch in *E. coli* exprimiertes PVY-Hüllprotein

Die nach B 3.4.3. aufgearbeiteten Proben wurden in einem ISEM mit PVY-spezifischem IgG auf virusähnliche Partikel hin untersucht.

Tab. 37: Ergebnisse der immunelektronenmikroskopischen Untersuchung auf Bildung von VLPs durch in *E. coli* exprimierte PVY-Hüllproteine im Vergleich mit der Bildung von VLPs durch entsprechende über pPVX P2A exprimierte PVY-Hüllproteine

exprimiertes Hüllprotein	VLP-Bildung durch in <i>E. coli</i> exprimiertes Hüllprotein		VLP-Bildung durch über pPVX P2A exprimiertes Hüllprotein
	ohne P2A	mit P2A	
py cp 1-267	+	+	+
py cp 40-267	+	+	+
py cp 41-267	+	-	-
py cp 1-238	+	+	+
py cp 1-237	+	-	-

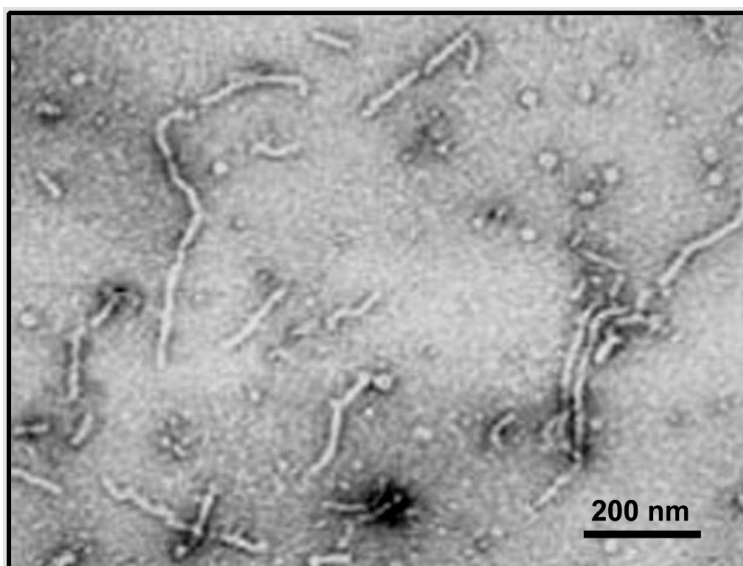


Abb. 48:  
Immunelektronenmikroskopische Aufnahme von VLPs, gebildet durch in *E. coli* exprimierte ganzlängige PVY-Hüllproteine. ISEM mit PVY-spezifischem IgG



Die Untersuchung der VLP-Bildung durch in *E. coli* exprimiertes PVY-Hüllprotein lieferte einige sehr interessante Ergebnisse (vgl. Tab. 37).

Wider Erwarten konnten bei Expression der PVY-Sequenzen ohne P2A in allen Fällen zahlreiche fadenförmige VLPs unterschiedlicher Länge detektiert werden (vgl. Abb. 48). Hing diesen Sequenzen allerdings das P2A-Oligopeptid an - wie es auch bei den über pPVX P2A exprimierten Hüllproteinen der Fall war - zeigte sich das gleiche Bild wie für die in Pflanzen exprimierten Sequenzen. Die über das pPVX P2A-System gewonnenen Erkenntnisse ließen sich somit auch im bakteriellen System reproduzieren. Allerdings schien die C-terminal anhängende P2A-Sequenz hier - anders als im Falle des TRV ON - einen entscheidenden Einfluß auf die Aggregationsfähigkeit der verkürzten PVY-Hüllproteine zu haben.

#### 4.2.4. Bildung virusähnlicher Partikel durch verschieden verkürzte Sequenzen des TEV-Hüllproteins

Auch das Hüllprotein des ebenfalls zu den Potyviren zählenden TEV weist die für diese Virusgruppe charakteristische Gliederung in einen variablen N-Terminus und einen hochkonservierten C-terminalen Teil, die Core-Region auf (vgl. C 4.2.3., Abb. 43). Wie bereits für das PVY-Hüllprotein sollte auch hier untersucht werden, inwieweit Bereiche dieser funktionell wichtigen Core-Region deletiert werden können, ohne daß die Fähigkeit zur Bildung von VLPs verloren geht, oder ob bereits Verkürzungen des variablen Teils zum Verlust dieser Fähigkeit führt.

Daher wurden unter Verwendung des pTEV H/C als Matrizen-DNA und der in Tab. 38 genannten Primerkombinationen folgende Konstrukte hergestellt:

Tab. 38: Beschreibung der pPVX-Konstrukte mit verschieden verkürzten TEV-Hüllproteingen-Sequenzen

pPVX P2A Ascl mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
<b>te cp 10-263</b>	te cp 3/te cp 2	N-terminal um 9 AS verkürzt
<b>te cp 19-263</b>	te cp 4/te cp 2	N-terminal um 18 AS verkürzt
<b>te cp 27-263</b>	te cp 5/te cp 2	N-terminal um 27 AS verkürzt
<b>te cp 32-263</b>	te cp 7/te cp 2	N-terminal um 31 AS verkürzt
<b>te cp 37-263</b>	te cp 8/te cp 2	N-terminal um 36 AS verkürzt
<b>te cp 38-263</b>	te cp 11/te cp 2	N-terminal um 37 AS verkürzt
<b>te cp 39-263</b>	te cp 16/te cp 2	N-terminal um 38 AS verkürzt
<b>te cp 40-263</b>	te cp 17/te cp 2	N-terminal um 39 AS verkürzt
<b>te cp 41-263</b>	te cp 18/te cp 2	N-terminal um 40 AS verkürzt
<b>te cp 42-263</b>	te cp 19/te cp 2	N-terminal um 41 AS verkürzt
<b>te cp 43-263</b>	te cp 12/te cp 2	N-terminal um 42 AS verkürzt
<b>te cp 51-263</b>	te cp 13/te cp 2	N-terminal um 50 AS verkürzt
<b>te cp 1-242</b>	te cp 1/te cp 10	C-terminal um 21 AS verkürzt
<b>te cp 1-229</b>	te cp 1/te cp 15	C-terminal um 34 AS verkürzt
<b>te cp 1-219</b>	te cp 1/te cp 21	C-terminal um 44 AS verkürzt
<b>te cp 1-213</b>	te cp 1/te cp 23	C-terminal um 50 AS verkürzt
<b>te cp 1-208</b>	te cp 1/te cp 24	C-terminal um 55 AS verkürzt
<b>te cp 1-207</b>	te cp 1/te cp 35	C-terminal um 56 AS verkürzt
<b>te cp 1-206</b>	te cp 1/te cp 36	C-terminal um 57 AS verkürzt
<b>te cp 1-205</b>	te cp 1/te cp 25	C-terminal um 58 AS verkürzt
<b>te cp 1-203</b>	te cp 1/te cp 26	C-terminal um 60 AS verkürzt
<b>te cp 1-200</b>	te cp 1/te cp 27	C-terminal um 63 AS verkürzt
<b>te cp 1-197</b>	te cp 1/te cp 28	C-terminal um 66 AS verkürzt

#### 4.2.4.1. Virusnachweis im ELISA und immunoelektronenmikroskopische Untersuchung

In allen untersuchten Pflanzen konnten mittels ELISA PVX-Partikel detektiert werden. Alle Konstrukte waren folglich infektiös.

Infiziertes Blattmaterial wurde in einem ISEM mit Dekorationstest unter Verwendung TEV-spezifischer Antikörper auf virusähnliche Partikel hin untersucht.

Die Untersuchung im Elektronenmikroskop zeigte, daß sich das TEV-Hüllprotein an seinem N-Terminus um bis zu 39 Aminosäuren verkürzen ließ, ohne daß dieses die Fähigkeit zur Bildung von VLPs verlor (vgl. Abb. 49). Somit wurde auch hier nicht nur ein Verlust des variablen Teils des Hüllproteins, sondern auch eine N-terminale Verkürzung der Core-Region um 10 Aminosäuren toleriert.

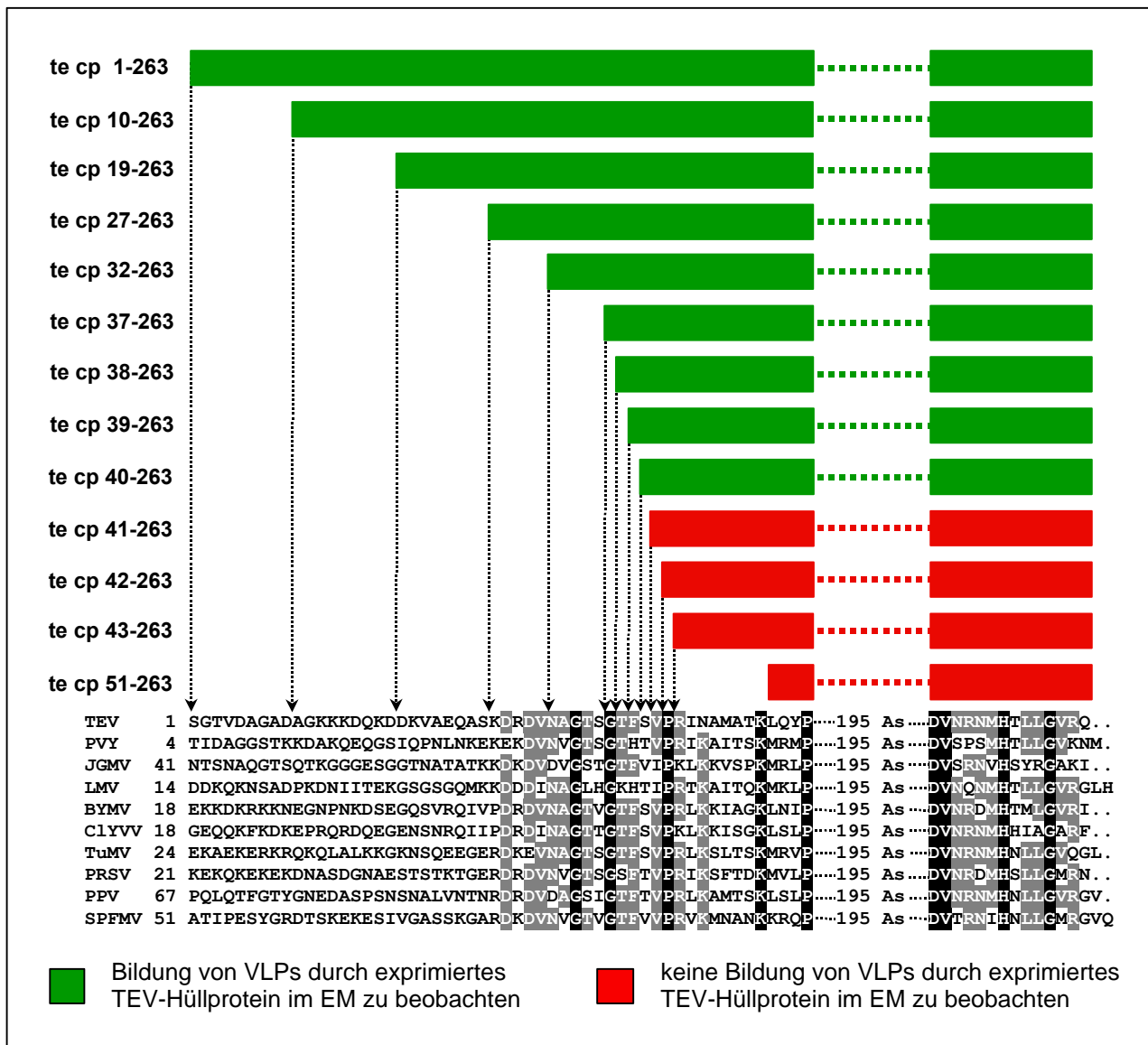


Abb. 49: Schematische Darstellung der VLP-Bildungsfähigkeit der über pPVX P2A AscI exprimierten N-terminal verkürzten TEV-Hüllproteine.

Die Balken über dem Alignment der Hüllproteinsequenzen verschiedener Potyviren geben den Bereich der exprimierten TEV-Hüllproteinsequenz an.

Am C-Terminus konnten dagegen weit mehr Aminosäuren entfernt werden, ohne daß die VLP-Bildungsfähigkeit beeinflussen wurde (vgl. Abb. 50). Selbst das Fehlen von bis zu 56 Aminosäuren beeinträchtigte die Aggregation zu TEV-ähnlichen Partikeln nicht. Wurden allerdings weitere Aminosäuren entfernt, konnten im Elektronenmikroskop keine VLPs mehr detektiert werden.

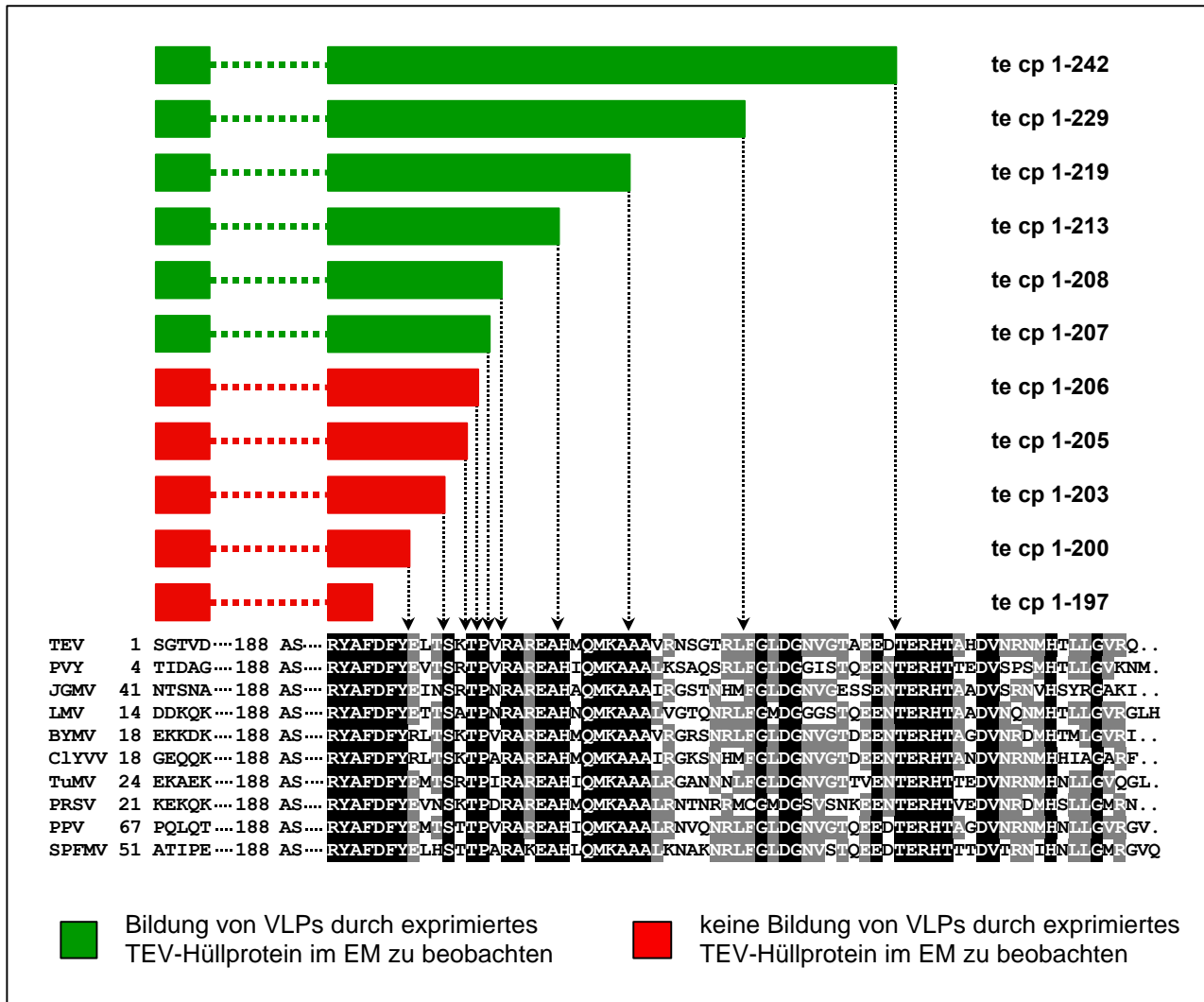


Abb. 50: Schematische Darstellung der VLP-Bildungsfähigkeit der über pPVX P2A Ascl exprimierten C-terminal verkürzten TEV-Hüllproteine. Die Balken über dem Alignment der Hüllproteinsequenzen verschiedener Potyviren geben den Bereich der exprimierten TEV-Hüllproteinsequenz an.

Auch die mit den verschiedenen pPVX P2A te cp-Konstrukten infizierten Pflanzen wurden zusätzlich einer Western-Analyse unterzogen, um das Vorhandensein von TEV-Hüllprotein auch in den Pflanzen, in denen keine VLPs detektiert werden konnten, zu überprüfen.

#### 4.2.4.2. Western-Analyse der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten TEV-Hüllproteinsequenzen

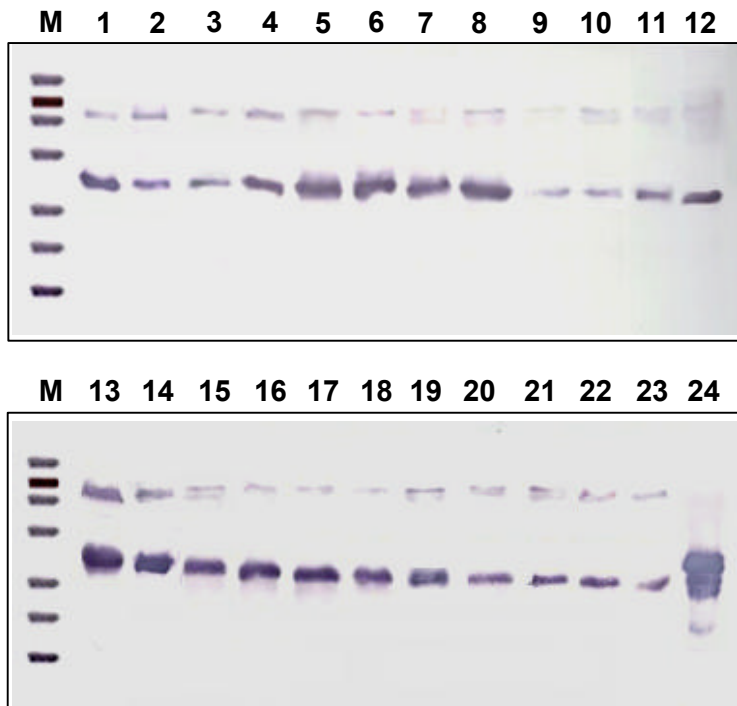


Abb. 51:

Immunoblots einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pPVX te cp-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen

Nachweis des TEV-Hüllproteins mit TEV-spezifischem IgG

aufgetragene Menge: 5 µl des Gesamtprotein-extrakts

**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder; **1:** te cp 10-263; **2:** te cp 19-263; **3:** te cp 27-263; **4:** te cp 32-263; **5:** te cp 37-263; **6:** te cp 38-263; **7:** te cp 39-263; **8:** te cp 40-263; **9:** te cp 41-263; **10:** te cp 42-263; **11:** te cp 43-263; **12:** te cp 51-263; **13:** te cp 1-242; **14:** te cp 1-229; **15:** te cp 1-219; **16:** te cp 1-213; **17:** te cp 1-208; **18:** te cp 1-207; **19:** te cp 1-206; **20:** te cp 1-205; **21:** te cp 1-203; **22:** te cp 1-200; **23:** te cp 1-197; **24:** TEV-Positivkontrolle

Tab. 39: Molekulargewichte der verschiedenen über pPVX P2A Ascl exprimierten TEV-Hüllproteine

über pPVX P2A Ascl exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa	über pPVX P2A Ascl exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa
te cp 10-263	30.56	te cp 1-242	28.86
te cp 19-263	29.56	te cp 1-229	27.34
te cp 27-263	28.73	te cp 1-219	26.53
te cp 32-263	28.12	te cp 1-213	25.81
te cp 37-263	27.69	te cp 1-208	25.22
te cp 38-263	27.63	te cp 1-207	25.12
te cp 39-263	27.53	te cp 1-206	25.03
te cp 40-263	27.38	te cp 1-205	24.93
te cp 41-263	27.30	te cp 1-203	24.71
te cp 42-263	27.20	te cp 1-200	24.37
te cp 43-263	27.10	te cp 1-197	23.94
te cp 51-263	25.71	<b>TEV-Positivkontrolle</b>	29.64

Wie aus Abb. 51 ersichtlich, konnte in allen pPVX te cp-infizierten Pflanzen TEV-Hüllprotein mit dem erwarteten Molekulargewicht nachgewiesen werden (vgl. auch Tab. 39). Auch geringe Mengen an Fusionsprotein aus TEV-Hüllprotein, P2A und PVX-Hüllprotein mit einem Molekulargewicht in Bereich zwischen 50 und 54 kDa traten in allen Proben auf.

Somit konnte davon ausgegangen werden, daß auch in den Pflanzen, in denen keine TEV-Partikel gefunden werden konnten, ausreichend TEV-Hüllprotein zur Verfügung stand. Folglich war ein Ausbleiben der VLP-Bildung auf den Verlust der Aggregationsfähigkeit der über pPVX P2A exprimierten verkürzten Hüllproteine zurückzuführen.

#### 4.2.4.3. Expression von TEV-Hüllprotein in *E. coli*

Auch für das TEV-Hüllprotein wurde die Reproduzierbarkeit der über das virale System gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf die Aggregationsfähigkeit verkürzter Hüllproteine in einem bakteriellen System überprüft.

Wie bereits für das PVY-Hüllprotein wurden auch hier für die Expression in Bakterien neben dem ganzlängigen Hüllprotein die N- bzw. C-terminal verkürzten TEV-Hüllproteinsequenzen gewählt, die gerade noch bzw. gerade nicht mehr dazu in der Lage waren, virusähnliche Partikel zu bilden. Zur Untersuchung einer eventuellen Beeinflussung der Bildung von VLPs durch das bei Expression über das pPVX P2A-System C-terminal anhängende P2A-Peptid, wurden die verkürzten Sequenzen sowohl mit als auch ohne diese zusätzlichen Aminosäuren exprimiert.

Zur Amplifikation der verschiedenen kodierenden Sequenzen wurden die in Tab. 40 angegebenen Primerkombinationen verwendet. Als Matrizen-DNA für die Konstrukte ohne P2A-Gensequenz wurde der cDNA-Klon pTEV H/C genutzt, während für die Varianten mit P2A-Gensequenz die pPVX P2A-Konstrukte als Template dienten, die bereits das entsprechend verkürzte TEV-Hüllproteingen tragen (vgl. C 4.2.4., Tab. 38). Nach diesem Prinzip wurden folgende Konstrukte erstellt:

Tab. 40: Beschreibung der pSBET b-Konstrukte mit verschieden verkürzten TEV-Hüllproteingen-Sequenzen mit und ohne P2A-Gensequenz

pSBET b mit	Primerkombination	Beschreibung des exprimierten Proteins
<b>te cp 1-263</b>	te cp 31/te cp 32	ganzlängiges TEV-Hüllprotein
<b>te cp 40-263</b>	te cp 33/te cp 32	N-terminal um 39 AS verkürzt
<b>te cp 41-263</b>	te cp 34/te cp 32	N-terminal um 40 AS verkürzt
<b>te cp 1-207</b>	te cp 31/te cp 38	C-terminal um 56 AS verkürzt
<b>te cp 1-206</b>	te cp 31/te cp 39	C-terminal um 57 AS verkürzt

<b>te cp 40-263 P2A</b>	te cp 33/P2A	N-terminal um 39 AS verkürzt; mit P2A
<b>te cp 41-263 P2A</b>	te cp 34/P2A	N-terminal um 40 AS verkürzt; mit P2A
<b>te cp 1-207 P2A</b>	te cp 31/P2A	C-terminal um 56 AS verkürzt; mit P2A
<b>te cp 1-206 P2A</b>	te cp 31/P2A	C-terminal um 57 AS verkürzt; mit P2A

Nach abgeschlossener Klonierung wurden die Konstrukte in den *E. coli*-Expressionsstamm BL 21 (DE3) retransformiert und nach dem unter B 3.4. beschriebenen Protokoll zur Expression eingesetzt. Die exprimierten Proteine wurden sowohl für eine Western-Analyse vorbereitet als auch einer Behandlung zur Aufreinigung von virusähnlichen Partikeln unterzogen.

#### a) Western-Analyse der in *E. coli* exprimierten TEV-Hüllproteine

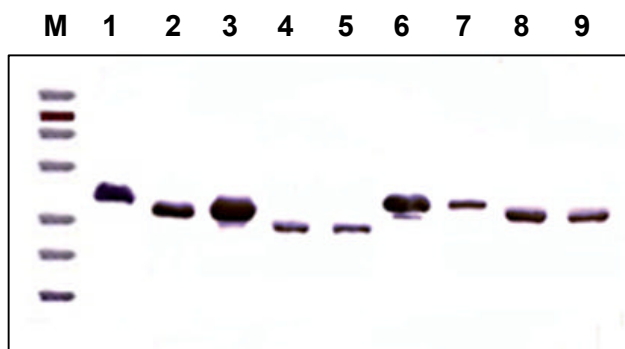


Abb. 52:

Immunoblot einer Western-Analyse verschiedener in *E. coli* exprimierter TEV-Hüllproteine  
Nachweis mit TEV-spezifischem IgG  
aufgetragene Menge: 3 µl Probe

**M:** BenchMark Prestained Protein Ladder;  
**1:** te cp 1-263; **2:** te cp 40-263; **3:** te cp 41-263; **4:** te cp 1-207; **5:** te cp 1-206; **6:** te cp 40-263 P2A; **7:** te cp 41-263 P2A; **8:** te cp 1-207P2A; **9:** te cp 1-206 P2A

über pSBET b exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa ohne P2A	Molekulargewicht in kDa mit P2A
<b>te cp 1-263</b>	29.64	—
<b>te cp 40-263</b>	25.69	27.38
<b>te cp 41-263</b>	25.61	27.30
<b>te cp 1-207</b>	23.43	25.12
<b>te cp 1-206</b>	23.32	25.03

Tab. 41:  
Molekulargewichte der verschiedenen in *E. coli* exprimierten TEV-Hüllproteine

Mit Hilfe der Western-Analyse konnte in allen Proben TEV-Hüllprotein mit dem erwarteten Molekulargewicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 52 und Tab. 41). Die Expression in *E. coli* war damit erfolgreich.

#### b) Untersuchung der VLP-Bildung durch in *E. coli* exprimiertes TEV-Hüllprotein

Die nach B 3.4.3. aufgearbeiteten Extrakte wurden in einem ISEM unter Verwendung von TEV-spezifischem Immunglobulin auf eventuell gebildete VLPs hin untersucht.

Tab. 42: Ergebnisse der immunelektronmikroskopischen Untersuchung auf Bildung von VLPs durch in *E. coli* exprimierte TEV-Hüllproteine im Vergleich mit der Bildung von VLPs durch entsprechende über pPVX P2A exprimierte TEV-Hüllproteine

exprimiertes Hüllprotein	VLP-Bildung durch in <i>E. coli</i> exprimiertes Hüllprotein		VLP-Bildung durch über pPVX P2A exprimiertes Hüllprotein
	ohne P2A	mit P2A	
<b>te cp 1-263</b>	+	+	+
<b>te cp 40-263</b>	+	+	+
<b>te cp 41-263</b>	+	-	-
<b>te cp 1-207</b>	+	+	+
<b>te cp 1-206</b>	+	-	-

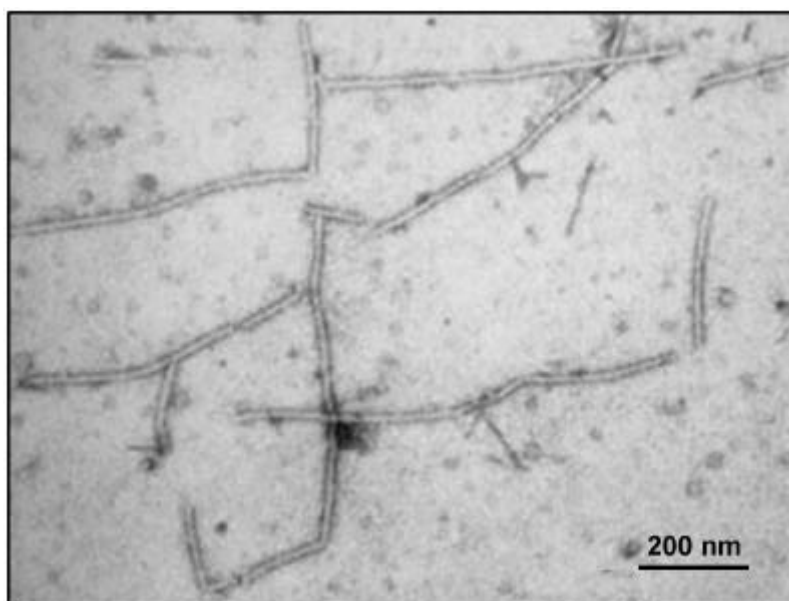


Abb. 53:  
Immunelektronenmikroskopische Aufnahme von VLPs, gebildet durch in *E. coli* exprimierte ganzlängige TEV-Hüllproteine. ISEM mit TEV-spezifischem IgG

Die Expression von verschiedenen verkürzten TEV-Hüllproteinen in *E. coli* lieferte ähnlich interessante Ergebnisse wie bereits das über Bakterien exprimierte PVY-Hüllprotein. Auch hier aggregierten sämtliche getestete TEV-Hüllproteinsequenzen ohne anhängendes P2A-Peptid zu VLPs (vgl. Tab. 42). In all diesen Fällen konnten im Elektronenmikroskop zahlreiche, teilweise sehr lange, fadenförmige VLPs detektiert werden (vgl. Abb. 53). Waren diese Sequenzen allerdings mit dem P2A-Peptid fusioniert, zeigte sich das gleiche Bild wie bei Expression über das pPVX P2A-System in Pflanzen. Eine N-terminale Verkürzung um mehr als 40 Aminosäuren bzw. eine C-terminale Verkürzung von mehr als 56 Aminosäuren führte hier ebenfalls zum Verlust der Aggregationsfähigkeit.

Dies verdeutlichte, daß im Falle des TEV-Hüllproteins die über das pPVX P2A-System gewonnenen Ergebnisse zwar durchaus reproduzierbar waren, daß aber die Fähigkeit zur VLP-Bildung auch hier maßgeblich durch die C-terminal anhängende P2A-Sequenz beeinflusst wurde.

### 4.3. Untersuchung der Bildung virusähnlicher Partikel durch über pTEV H/C Ascl exprimierte Hüllproteine verschiedener Viren

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden *N. benthamiana*-Pflanzen mit den unter C 3., Tab. 23 beschriebenen Konstrukten inokuliert. 10-16 Tage nach Inokulation wurden Proben des infizierten Blattmaterials im ISEM mit Dekorationstest untersucht. Zur Detektion der TEV-Partikel wurde TEV-spezifisches Immunglobulin verwendet, während der Nachweis der eventuell durch die exprimierten ‚Fremd‘-Hüllproteine entstandenen VLPs mit Hilfe der für die entsprechenden Viren spezifischen Immunglobuline erfolgte.

Tab. 43: Ergebnisse der immunelektronenmikroskopischen Untersuchung der mit verschiedenen pTEV H/C-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen (rr: 1 Partikel pro 50 Beobachtungsfelder; r: 1 Partikel pro 10 Beobachtungsfelder; +: 1-10 Partikel pro Beobachtungsfeld; ++: 10 - 100 Partikel pro Beobachtungsfeld)

Wirtspflanze infiziert mit	Nachweis mit TEV-spezifischem Immunglobulin	Nachweis mit Fremdprotein-spezifischem Immunglobulin
pTEV H/C cy cp	+ Fäden stark dekoriert	rr Fäden undekoriert
pTEV H/C cb cp	++ Fäden stark dekoriert	r Fäden undekoriert
pTEV H/C px cp	+ Fäden stark dekoriert	rr Fäden undekoriert
pTEV H/C py cp	+ Fäden stark dekoriert	r Fäden undekoriert
pTEV H/C ON cp	+ - ++ Fäden stark dekoriert	rr Fäden undekoriert
pTEV H/C ORY cp	+ Fäden stark dekoriert	r Fäden undekoriert

Die in Tab. 43 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, daß in allen untersuchten Pflanzen zahlreiche TEV-Partikel zu finden waren. Dagegen konnten in keiner der Pflanzen durch exprimiertes ‚Fremd‘-Hüllprotein gebildete VLPs nachgewiesen werden. Bei den wenigen, zu detektierenden, undekorierten Fäden handelte es sich ebenfalls um TEV-Partikel, die durch unspezifische Bindung auf den Netzen verblieben waren.

Auszuschließen war, daß gar kein Fremdprotein exprimiert wurde, da dieses Teil des TEV-Polyproteins ist und damit zwangsläufig ebenfalls gebildet werden muß, wenn TEV-Partikel vorliegen. Die Ergebnisse deuteten vielmehr darauf hin, daß die über pTEV H/C Ascl exprimierten Hüllproteine entweder nicht dazu in der Lage waren, zu VLPs zu aggregieren oder daß zwar Fremdprotein gebildet wurde, dieses aber sofort wieder durch pflanzeigene Proteasen abgebaut wurde.

Um eine vorzeitige proteolytische Degradation auszuschließen, wurden Gesamtproteinextrakte aus den infizierten Pflanzen in einer Western-Analyse auf Vorhandensein des Fremdproteins untersucht.

#### 4.3.1. Western-Analyse der über pTEV H/C Ascl exprimierten Hüllproteine verschiedener Viren

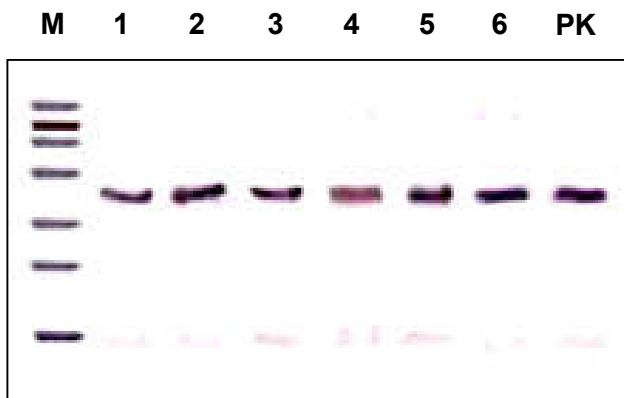


Abb. 54:

Immunoblot einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pTEV H/C-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen. Nachweis des TEV-Hüllproteins mit TEV-IgG aufgetragene Menge: 1 µl des Gesamtproteinextrakts. **M**: BenchMark Prestained Protein Ladder; **1**: pTEV H/C cy cp; **2**: pTEV H/C cb cp; **3**: pTEV H/C px cp; **4**: pTEV H/C py cp; **5**: pTEV H/C ON cp; **6**: pTEV H/C ORY cp; **PK**: Proteinextrakt aus pTEV H/C Ascl-infizierter Pflanze.

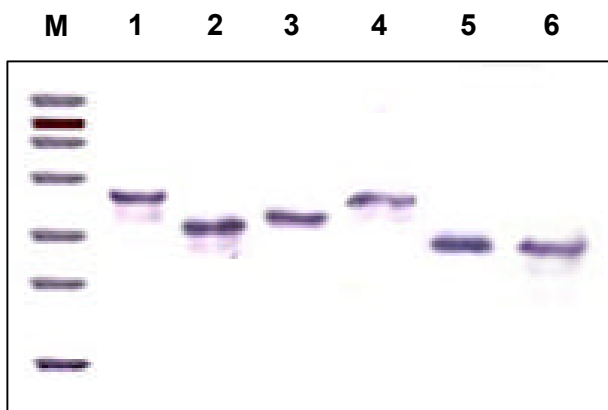


Abb. 55:

Immunoblot einer Western-Analyse der isolierten Proteine aus mit verschiedenen pTEV H/C-Konstrukten infizierten *N. benthamiana*-Pflanzen. Nachweis der verschiedenen 'Fremd'-Hüllproteine mit entsprechend spezifischem IgG aufgetragene Menge: 10 µl des Gesamtproteinextrakts. **M**: BenchMark Prestained Protein Ladder; **1**: pTEV H/C cy cp; **2**: pTEV H/C cb cp; **3**: pTEV H/C px cp; **4**: pTEV H/C py cp; **5**: pTEV H/C ON cp; **6**: pTEV H/C ORY cp.

über pTEV H/C Ascl exprimiertes Hüllprotein	Molekulargewicht in kDa
TEV cp	29.6
CIYVV cp	33.7
CymMV cp	25.5
PVX cp	26.7
PVY cp	31.6
TRV ON cp	24.2
TRV ORY cp	24.1

Tab. 44:

Molekulargewichte der verschiedenen, über pTEV H/C Ascl exprimierten Hüllproteine verschiedener Viren.

Wie die Western-Analyse zeigte, lag in den infizierten Pflanzen sowohl TEV-Hüllprotein als auch die über pTEV H/C Ascl exprimierten Hüllproteine verschiedener Viren vor (vgl. Abb. 54 und Abb. 55). Die Banden entsprachen alle dem für das jeweilige Protein



erwarteten Molekulargewicht (vgl. Tab. 44), wobei zu beachten war, daß die über pTEV H/C *Ascl* exprimierten Hüllproteine ein um ~1.7 kDa höheres Molekulargewicht aufwiesen als die reinen Hüllproteinsequenzen, da infolge der Prozessierung des bei der Proteinsynthese zunächst entstehenden Polyproteins am N- und am C- Terminus der Fremdsequenz 11 bzw. 9 zusätzliche Aminosäuren verblieben.

Das Ausbleiben der VLP-Bildung schien damit auf die Unfähigkeit der exprimierten Hüllproteine zur Aggregation zurückzuführen zu sein. Worin allerdings der Grund für diese Unfähigkeit lag, konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Vergleicht man die hier erhaltenen Ergebnisse mit denen im pPVX P2A-System (vgl. C 4.2.) gewonnenen, so wäre zu erwarten gewesen, daß zumindest im Fall des PVY-, des TRV ON- oder des TRV ORY-Hüllproteins eine Aggregation zu beobachten gewesen wäre, da dieses im pPVX P2A-System und auch im bakteriellen System nachgewiesen werden konnte.

Die Vermutung lag nahe, daß die bei der Prozessierung an der Fremdsequenz verbleibenden zusätzlichen Aminosäuren an N- und C-Terminus eventuell störend auf die Bildung der VLPs wirken könnten. Hierbei könnten besonders die N-terminalen Sequenzen eine Rolle spielen, da die über das pPVX P2A-System exprimierten ganzlängigen Hüllproteine am C-Terminus ebenfalls zusätzliche Aminosäuren trugen, die die Fähigkeit zur VLP-Bildung offensichtlich nicht maßgeblich beeinflussten (vgl. C 4.2.).

Aus diesem Grund wurde ein neues auf der TRV ON-Hüllproteinsequenz basierendes Konstrukt erstellt, das N-terminal eben die Aminosäuren aufwies, die sich auch bei dem über pTEV H/C *Ascl* exprimierten Hüllprotein dort befinden. Diese so veränderte Sequenz wurde dann über pPVX P2A *Ascl* exprimiert, so daß in der Pflanze schließlich ein ganzlängiges TRV ON-Hüllprotein mit 11 zusätzlichen Aminosäuren aus dem pTEV H/C-Vektor am N-Terminus und den 19 Aminosäuren des P2A-Oligopeptids am C-Terminus vorlag. Das Verhalten dieses Proteins sollte dann eine Aussage über die Auswirkungen zusätzlicher Sequenzen an N- und C-Terminus auf die Fähigkeit zur VLP-Bildung ermöglichen.

#### **4.3.2. Einfluß zusätzlicher N- und C-terminaler Sequenzen auf die Fähigkeit des TRV ON-Hüllproteins zur Bildung von virusähnlichen Partikeln**

Für die Amplifikation der veränderten TRV ON-Hüllproteinsequenz wurde die Primerkombination ON cp TEV/ON cp 2 zusammen mit TRV ON-cDNA verwendet. ON cp TEV trägt außer der 5'-terminalen Sequenz des TRV ON-Hüllproteingens an seinem 5'-Ende eine *Ascl*-Erkennungssequenz gefolgt von einem Startcodon und der kodierenden Sequenz für die 11 Aminosäuren SDHHHHHHGRA, die bei der Expression über pTEV H/C *Ascl* nach Prozessierung des Polyproteins an der Fremdsequenz verbleiben. Bei ON cp 2 handelt es sich um den antisense-Primer, der auch sonst für die Amplifikation des ganzlängigen TRV ON-Hüllproteingens verwendet wurde. Das PCR-Produkt wurde über *Ascl* in pPVX P2A *Ascl* eingebracht und das fertige Konstrukt auf eine *N. benthamiana*-Pflanze abgerieben.

Eine immunelektronenmikroskopische Untersuchung des infizierten Pflanzenmaterials zeigte neben fadenförmigen PVX-Partikeln überraschenderweise auch zahlreiche TRV-typische Stäbchen (vgl. Abb. 56). Das veränderte TRV ON-Hüllprotein war damit sehr wohl in der Lage, VLPs zu bilden. Die zusätzlichen N- und C-terminalen Aminosäuren schienen keinen unmittelbaren Einfluß auf die Aggregationsfähigkeit zu haben. Warum das über pTEV H/C *Ascl* exprimierte TRV ON-Hüllprotein dennoch nicht zur Bildung von VLPs befähigt war, konnte anhand dieser Ergebnisse leider nicht geklärt werden.

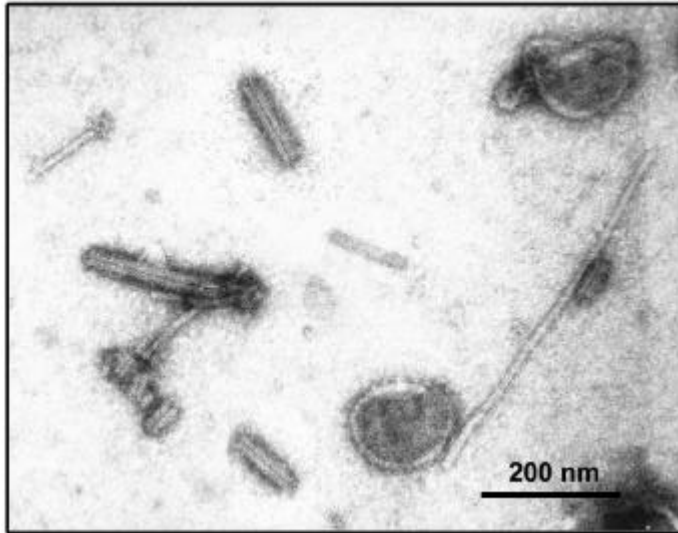


Abb. 56:  
Elektronenmikroskopische Aufnahme von VLPs, gebildet durch über pPVX P2A Ascl exprimierte TRV ON-Hüllproteine mit zusätzlichen N- und C-terminalen Sequenzen

Da sich das pTEV H/C-System weder für die Ermittlung des antiviralen Potentials der verwendeten Fremdsequenzen noch für die Untersuchung der VLP-Bildungsfähigkeit von Hüllproteinen bewährt hatte, wurden mit diesem System keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

## D. Diskussion

Pflanzenviren verursachen weltweit signifikante Ernteverluste in nahezu allen wirtschaftlich bedeutenden Pflanzenspecies. Die Gewinnung virusresistenter Pflanzen mit Hilfe gentechnischer Methoden hat daher in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung gewonnen. Durch Integration bestimmter Nukleinsäuresequenzen mit antiviraler Wirkung in das pflanzliche Genom konnten bereits gegen viele Pflanzenviren Resistenzen in verschiedenen Pflanzenarten erzeugt werden (Beachy, 1997a; de Haan, 1998; Hull and Davies, 1992; Scholthof et al., 1993; Wilson, 1993). Bisher ist allerdings nur wenig über den eigentlichen Prozeß bekannt, der in den transgenen Pflanzen zur Ausbildung einer Virusresistenz führt. Somit ist es zur Zeit noch nicht möglich, vorab Aussagen über das antivirale Potential einer Nukleinsäuresequenz zu treffen. Die Beurteilung der Effektivität einer Sequenz kann erst nach Testung im transgenen System erfolgen. Die Herstellung transgener Pflanzen ist allerdings ein sehr zeitaufwendiger und arbeitsintensiver Prozeß und erlaubt lediglich die Testung einer sehr begrenzten Anzahl von Sequenzen. Aus diesem Grund unterbleibt meist eine Optimierung der resistenzauslösenden Sequenzen, durch die sich nicht nur eine verbesserte Wirkungsweise, sondern z.B. auch ein höherer Status an biologischer Sicherheit erreichen lassen könnte.

Ein einfaches Testsystem, mit dessen Hilfe sich das antivirale Potential beliebiger Nukleinsäuresequenzen schnell und effektiv bestimmen läßt, könnte damit einen signifikanter Beitrag zur Erzeugung von Virusresistenzen in Pflanzen leisten.

Eine ideale Grundlage für die Entwicklung eines solchen Systems bilden infektiöse Vollängenklone von Pflanzenviren. Es handelt sich hierbei um ganzlängige cDNA-Sequenzen viraler RNAs, die unter die Kontrolle eines geeigneten Promotors gestellt wurden. Durch einfache Inokulation des Vollängenklons bzw. eines darauf basierenden RNA-Transkripts kann in einer entsprechenden Wirtspflanze eine normale Virusinfektion erzeugt werden.

Mit Hilfe eines auf viralen Vollängenklonen basierenden Expressionssystems sollte es möglich sein, eine Vielzahl verschiedener Nukleinsäuresequenzen innerhalb von kurzer Zeit auf ihr antivirales Potential hin zu untersuchen. Eine zu testende Sequenz wird lediglich in einen geeigneten cDNA-Klon integriert und zusammen mit der viralen Sequenz in einer durch das veränderte Konstrukt infizierten Pflanze zur Expression gebracht. Der Einfluß der exprimierten Sequenz auf die Virusreplikation und/oder -ausbreitung sollte sich dann anhand der auftretenden Symptome und der Virusakkumulation beurteilen lassen. Die Resistenzwirkung einer Fremdsequenz könnte sowohl gegenüber dem exprimierenden Virus selbst (homologes System) als auch - im Rahmen von Doppelinfektionstests - gegenüber anderen Viren (heterologes System) untersucht werden. Darüberhinaus könnten Sequenzen mit bereits bekannter antiviraler Wirkung hinsichtlich ihrer Effektivität und ihrer biologische Sicherheit optimiert werden.

Nukleinsäuresequenzen, die sich in diesem System schließlich als resistenzerzeugend erwiesen haben, können dann in transgene Pflanzen eingebracht und auf ihre Resistenzwirkung im transgenen System hin überprüft werden. Durch den vorgeschalteten Selektionsprozeß über das virale System können aus einer Vielzahl verschiedener Sequenzen diejenigen herausgefiltert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auch im transgenen System zu einer Resistenz führen.

Die Entwicklung eines solchen, auf viralen Vollängenklonen basierenden Systems zur Evaluierung des antiviralen Potentials von Nukleinsäuresequenzen stand nun im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit.

## 1. Schwierigkeiten bei der Herstellung infektiöser Vollängenklone der *Tobacco rattle virus* RNA1 und RNA2

Für die Etablierung eines Testsystems sollten geeignete virale Vollängenklone auf der Basis der *Tobacco rattle virus* RNA1 und RNA2 zunächst selbst hergestellt werden. Hierbei traten allerdings verschiedene unter C 1.1. beschriebene Schwierigkeiten auf, so daß von der ursprünglichen Planung abgesehen werden mußte.

Aus welchen Gründen die Herstellung infektiöser Vollängenklone der TRV RNA1 und 2 verschiedener Isolate erfolglos blieb, konnte nicht ermittelt werden. Zumal es einigen anderen Arbeitsgruppen durchaus gelungen ist, funktionsfähige TRV-Vollängenklone zu konstruieren und erfolgreich für eine Fremdgenexpression einzusetzen (Angenent et al., 1989; Guilford et al., 1991; Hamilton and Baulcombe, 1989; MacFarlane and Popovich, 2000; Ratcliff et al., 2001). Eine Toxizität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten ganzlängigen TRV-Sequenzen gegenüber den für die Klonierung genutzten Bakterienstämmen könnte einen möglichen Erklärungsansatz darstellen. Ähnliche Phänomene sind bereits für einige andere Viren beschrieben worden (Fakhfakh et al., 1996; Jakab, 1997; Johansen, 1996; Quillet et al., 1989; Yang, 1998).

## 2. Gewinnung eines für die Expression von Nukleinsäuresequenzen geeigneten viralen Vektorsystems

Voraussetzung für eine effiziente Expression von Fremdsequenzen über virale cDNA-Klone ist ein zuverlässiges und leicht handhabbares Vektorsystem. Wichtige Kriterien zur Bewertung eines solchen Systems sind hierbei:

- ein unkompliziertes Einführen der Fremdsequenz in die virale Sequenz
- eine hohe Infektionsrate der inokulierten Pflanzen
- eine gleichmäßige Ausbreitung der Infektion in der Wirtspflanze
- Stabilität der eingeführten Fremdsequenz über den gesamten Infektionszeitraum
- eine zuverlässige Expression der Fremdsequenz zu hohen Anteilen

Diese Kriterien wurden bei der Testung viraler Vollängenklone auf Eignung zur Expression von Nukleinsäuresequenzen in Pflanzen berücksichtigt. Infektiöse cDNA-Klone der Viren CIYVV, CymMV, PVX und TEV dienten als Ausgangskonstrukte für diese Untersuchungen. Zunächst wurden die Vollängenklone dieser Viren durch spezifische Modifikationen, wie der Einführung einer *Ascl*-Restriktionsschnittstelle zur Einklonierung der Fremdsequenz und - im Falle des pCymMV - der Integration zusätzlicher Sequenzen, die eine unabhängige Expression der Fremdsequenz erlauben, für den Einsatz als Expressionsvektor vorbereitet. In sämtliche Klone wurde über die *Ascl*-Schnittstelle die Gensequenz für das Markerprotein GFP integriert, das sich aufgrund seiner moderaten Größe und seiner einfachen Nachweisbarkeit als Testsequenz anbot. Die auf diese Weise modifizierten Vollängenklone wurden durch mechanische Inokulation in geeignete Wirtspflanzen eingebracht und die Infektionsrate, die Stabilität des GFP-Inserts und die Expression des GFP in den infizierten Pflanzen untersucht.

## 2.1. Beurteilung der Infektionsraten der verschiedenen viralen cDNA-Klone

Mit Ausnahme des auf pCymMV basierenden cDNA-Klones wiesen alle getesteten Konstrukte eine hohe Infektionsrate auf. Mindestens vier von fünf inokulierten Pflanzen zeigten innerhalb eines angemessenen Zeitraums die für das jeweilige Virus typischen Symptome. Das Kriterium einer zuverlässig erfolgenden Infektion war für diese Konstrukte damit gegeben.

Das vollständige Ausbleiben einer Infektion im Falle des pCymMV P2A GFP war vermutlich auf die Fehlerhaftigkeit des Konstruktes selbst zurückzuführen. Wie sich bei einer nachfolgenden Analyse möglicher Fehlerquellen herausstellte, könnte die Ursache für die nicht vorhandene Infektiosität in einer fehlerhaften Integration der P2A-Gensequenz in die virale Sequenz liegen. Ausgehend von auf Nukleinsäureebene miteinander gekoppelten Sequenzen vermittelt das P2A-Oligopeptid auf translationeller Ebene die Entstehung von Einzelproteinen und sollte hier eine getrennte Expression des GFP und des CymMV-Hüllproteins unter gemeinsamer Nutzung des subgenomischen Hüllprotein-Promotors ermöglichen. Dieser Prozeß erfordert allerdings unbedingt einen Prolinrest, der direkt auf die P2A-Sequenz folgt (Santa Cruz et al., 1996). Bei der Herstellung des pCymMV P2A GFP wurde diese Anforderung nicht beachtet. An die P2A-Sequenz schließt sich hier nicht der erforderliche Prolinrest an, sondern ein durch die nachfolgende CymMV-Hüllproteinsequenz bestimmter Glycinrest. Dieser Konstruktfehler hatte vermutlich zur Folge, daß P2A die gewünschte Trennung von GFP und Hüllprotein nicht vermitteln konnte. Anstelle zweier voneinander unabhängiger Proteine entstand ausschließlich ein Fusionsprotein aus GFP, P2A und CymMV-Hüllprotein, welches die für eine erfolgreiche Infektion erforderlichen Funktionen nicht erfüllen konnte.

Zur Behebung dieses Fehlers hätten außer des Methioninrests lediglich zwei weitere Aminosäuren vom N-Terminus des CymMV-Hüllproteins entfernt werden müssen, da die CymMV-Hüllproteinsequenz in vierter Position natürlicherweise einen Prolinrest besitzt, der für die Herstellung eines funktionsfähigen Konstrukts hätte genutzt werden können. Da aber bereits das unveränderte Ausgangskonstrukt eine nur sehr geringe Infektionsrate aufwies und die Wahrscheinlichkeit relativ hoch ist, die Infektiosität durch Einführung zusätzlicher Modifikationen weiter herabzusetzen, wurde auf die Erstellung eines neuen Konstrukts verzichtet.

## 2.2. Beurteilung der Stabilität des Inserts

Alle getesteten Konstrukte zeigten - mit Ausnahme des auf pPVX 201 basierenden Konstrukts - eine hohe Insertstabilität. Die in die cDNA-Klone integrierte GFP-Gensequenz konnte über den gesamten Probenzeitraum von mindestens 30 Tagen nach Inokulation mittels PCR in den infizierten Pflanzen nachgewiesen werden.

Im Falle des pPVX 201 AscI GFP trat eine sichtbare Infektion im Vergleich zum Ursprungskonstrukt erst verzögert auf. Selbst zum ersten Probenzeitpunkt konnte mittels PCR mit GFP-spezifischen Primern keine GFP-Gensequenz in den infizierten Pflanzen nachgewiesen werden. Bei Verwendung insertumfassender PVX-spezifischer Primer ergab sich ein PCR-Produkt, welches der Größe eines Amplifikats ohne integrierter GFP-Gensequenz entsprach. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß das GFP-Gen frühzeitig durch Rekombination aus dem Genom des PVX eliminiert wurde. Ermöglicht wird dies durch die über weite Strecken homologen Bereiche, die durch Verdopplung der Hüllprotein-Promotorsequenz entstanden sind.

Das Problem mangelnden Insertstabilität aufgrund homologer Rekombination in cDNA-Konstrukten mit verdoppeltem Hüllprotein-Promotor ist bereits seit einiger Zeit bekannt.

Chapman et al. (1992) konnten für ein mit dem hier verwendeten PVX-Klon eng verwandtes Konstrukt ähnliche Beobachtungen machen. Ein über den verdoppelten Hüllprotein-Promotor exprimiertes GUS-Gen wurde einige Zeit nach Infektion durch homologe Rekombination vollständig eliminiert. In jungen systemisch infizierten Blättern konnte schließlich nur noch die Ursprungssequenz des PVX-Vollängenklons nachgewiesen werden.

Ähnliches konnte auch von Dawson et al. (1989) anhand eines auf TMV basierenden Vollängenklons mit integriertem CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase)-Gen beobachtet werden. Im Laufe der Infektion wurde das über einen verdoppelten TMV-Hüllproteinpromotor exprimierte Gen ebenfalls vollständig eliminiert. Ca. 30 Tage nach Inokulation bestand mehr als 90 % der Viruspopulation in systemisch infizierten Blättern aus der ursprünglichen Wildtyp-Sequenz.

In beiden Fällen trat der Verlust des Inserts allerdings erst einige Zeit nach Ausbruch einer sichtbaren Infektion ein, während im Fall des pPVX 201 Ascl GFP das Insert zu einem sehr frühen Zeitpunkt noch vor Auftreten der ersten Symptome deletiert zu werden schien. Der frühzeitige Insertverlust wurde vermutlich dadurch gefördert, daß neben der verdoppelten Promotorsequenz die das Insert flankierenden Ascl-Schnittstellen bestehend aus reinen GC-Sequenzen eine homologe Rekombination zusätzlich begünstigten. Das im Vergleich zum Ursprungs-konstrukt verzögerte Erscheinen der ersten Anzeichen einer Infektion könnte darauf hinweisen, daß sich das veränderte Konstrukt nur sehr schlecht vermehren konnte und die Infektion sich erst dann erfolgreich etablieren konnte, nachdem das Insert durch homologe Rekombination beseitigt und damit die Sequenz des vitaleren Ursprungsvirus wiederhergestellt worden war.

Eine Möglichkeit, dem Phänomen der homologen Rekombination in Vollängenklonen mit dupliziertem Hüllprotein-Promotor entgegenzuwirken, ist die Verwendung heterologer Hüllprotein-Promotorsequenzen verwandter Viren, die zwar die gleiche Funktion erfüllen, aber nur geringe Sequenzhomologien aufweisen. Beispiele für diese Strategie der erfolgreichen Fremdgenexpression über infektiöse cDNA-Klone sind ein auf TMV basierendes Hybrid-Virus mit integrierter Hüllprotein-Promotorsequenz aus dem verwandten Tobamovirus *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) (Donson et al., 1991) oder die viralen Vollängenklone der RNA2 dreier verschiedener Tobraviren (TRV, PEBV und PepRSV) mit einem zweiten, jeweils aus einem der anderen Viren stammenden Hüllprotein-Promotor (MacFarlane and Popovich, 2000).

### 2.3. Beurteilung der Effizienz der Fremdgenexpression

Mit Hilfe einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung konnte in den durch die Konstrukte pCIYVV Ascl/Nla GFP, pPVX P2A Ascl GFP und pTEV H/C Ascl GFP infizierten Pflanzen eine effiziente GFP-Expression nachgewiesen werden. Keine GFP-Fluoreszenz konnte dagegen in den durch pPVX 201 Ascl GFP infizierten Pflanzen detektiert werden. Die fehlende GFP-Expression war - wie in D 2.2. bereits diskutiert - auf einen frühzeitigen Verlust des GFP-Inserts durch homologe Rekombination zurückzuführen.

Obwohl der Vollängenklon pCIYVV Ascl/Nla GFP eine hohe Insertstabilität und eine effiziente GFP-Expression in infiziertem Gewebe aufwies, eignete er sich nicht für die im Projekt geplanten Arbeiten, da sich die Infektion - und damit auch die Fremdgenexpression - auf nur wenige punktförmige Bereiche auf der infizierten Pflanze beschränkte. Die Voraussetzung einer gleichmäßigen systemischen Verteilung über die gesamte inokulierte Pflanze war damit nicht gegeben. pCIYVV Ascl Nla wurde daher für weiterführende Untersuchungen nicht mehr verwendet.

Von sämtlichen getesteten Vollängenklonen erfüllten schließlich nur die Konstrukte pPVX P2A Ascl und pTEV H/C Ascl die an sie gestellten Kriterien. Diese Konstrukte wurden im folgenden für die Untersuchung des antiviralen Potentials von Nukleinsäuresequenzen eingesetzt.

### **3. Versuche zur Nutzung viraler Vollängenklone in Doppelinfektionsversuchen als Basis für ein heterologes Testsystem**

Auf Doppelinfektionen basierende Systeme zur Untersuchung der Auswirkungen von über virale Vollängenklone exprimierten Sequenzen auf ein zweites Virus wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich angewendet. So konnten Lu et al. (1998) mit Hilfe eines Doppelinfektionstest zeigen, daß über einen PVX-Vollängenklon exprimiertes TMV-Hüllprotein eine Verzögerung einer nachfolgenden TMV-Infektion von bis zu zwei Wochen erwirken konnte. Scholthof et al. (1995) nutzten dieses System zur Funktionsanalyse eines Gens des Tombusvirus *Tomato bushy stunt virus* (TBSV). Durch Doppelinfektion einer Wirtspflanze mit einem dieses Gen exprimierenden PVX-Vollängenklon und einer Transport-defizienten Mutante des TBSV konnte eine erfolgreiche Komplementation des Transportdefekts durch das über PVX exprimierte TBSV-Protein beobachtet werden.

In Anlehnung an die in der Literatur genannten Beispiele wurde versucht, mit Hilfe der infektiösen cDNA-Klone pPVX P2A Ascl und pTEV H/C Ascl ein auf Doppelinfektionen basierendes, heterologes Testsystem (vgl. A 4.) zu etablieren. Dieser Ansatz erwies sich jedoch als nicht praktikabel, da beide Vollängenklone bereits ohne insertierte Testsequenz stark mit der Vermehrung der für die Testung vorgesehenen Viren (PVY, TEV und TRV für pPVX P2A Ascl und PVX, PVY und TRV für pTEV H/C Ascl) interferierten. Dies ist vermutlich auf die starke Symptombildung und die damit verbundene Schädigung des infizierten Gewebes zurückzuführen, die bei Infektion mit den hier verwendeten viralen Vollängenklonen in den inokulierten Pflanzen zu beobachten war. Eine Möglichkeit diese Schwierigkeit zu überwinden, wäre die Nutzung eines viralen Vollängenklons, der auf einem Virus basiert, das natürlicherweise nur sehr milde Symptome verursacht.

Da sich die hier verwendeten Vollängenklone als nicht geeignet für die Anwendung in Doppelinfektionsversuchen erwiesen hatten, wurde die Möglichkeit eines heterologen Testsystems nicht weiter verfolgt. In den folgenden Ansätzen wurde daher im Rahmen eines homologen Testsystems der Einfluß von Nukleinsäuresequenzen auf die durch die Vollängenklone pPVX P2A Ascl und pTEV H/C Ascl hervorgerufene Infektion selbst untersucht.

### **4. Ermittlung des antiviralen Potentials von verschiedenen Bereichen des PVX-Genoms in einem homologen Testsystem**

Virale Sequenzen haben sich im transgenen System als ideale Kandidaten für die Erzeugung von Virusresistenzen in Pflanzen erwiesen (vgl. A 1.3.). Auch für das PVX existieren einige Veröffentlichungen, die sich mit der resistenzerzeugenden Wirkung verschiedener Bereiche des PVX-Genoms beschäftigen (vgl. A 3.3.). Somit bietet es sich an, diese Sequenzen mit Hilfe des pPVX P2A-System auf ihr antivirales Potential hin zu untersuchen.

#### 4.1. Teilbereiche des Replikations-assoziierten Proteins P166

Bei Expression verschiedener Teilbereiche des P166 über das pPVX P2A-System konnte für einige dieser Sequenzen eine gewisse Beeinflussung der durch den viralen Vollängenklon verursachten Virusinfektion beobachtet werden (vgl. C 2.1.1.). Während die Expression von zwei der untersuchten Teilstücke zu einer Symptomverstärkung führte, konnte für fünf andere Teilbereiche eine deutliche Abschwächung der Symptome beobachtet werden. Eine Beeinträchtigung der Virusreplikation oder der systemischen Ausbreitung konnte in allen Fällen ausgeschlossen werden.

Worauf die Beeinflussung der Symptomatologie in den mit verschiedenen pPVX P2A 166k-Konstrukten infizierten Pflanzen zurückzuführen war, konnte anhand der vorliegenden Erkenntnisse nicht geklärt werden. Falls es sich bei den beobachteten Abschwächungen der Symptomausprägung tatsächlich um eine Resistenzwirkung der entsprechenden Sequenzen gegenüber PVX handelte, so basiert der dahinterstehende Mechanismus wahrscheinlich auf einem anderen Prozeß als der für die ganzlängige PVX-Replikase-Komponente und ihre Mutanten in transgenen Pflanzen ermittelte Mechanismus der RNA-vermittelten, homologieabhängigen Resistenz (vgl. A 3.3.1.). Anlass zu dieser Vermutung gibt die durch das hier verwendete pPVX P2A-System vorgegebene Expressionsstrategie. Im pPVX P2A-Konstrukt liegt das Fremdgen in einem Leseraster mit den nachgeschalteten Gensequenzen für P2A und PVX-Hüllprotein vor. Die Fremdsequenz wird somit immer als Teil einer Poly-mRNA transkribiert; eine eigenständige mRNA wird nicht gebildet. Dieses führt mit hoher Wahrscheinlichkeit dazu, daß ein auf RNA-Ebene ablaufender Prozeß, wie die Erzeugung einer RNA-vermittelten Resistenz, nicht mehr erfolgen kann.

#### 4.2. Die Komponenten des *Triple gene blocks*

Die für die Transportproteine P25, P12 und P8 kodierenden ORFs des PVX-*Triple gene blocks* wurden ebenfalls auf ihr antivirales Potential gegenüber PVX untersucht. Da es sich bei der Transportprotein-vermittelten Resistenz um einen Prozeß auf Protein-Ebene handelt (vgl. A 3.3.2.), erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, daß sich durch Expression dieser Sequenzen über das pPVX P2A-System ähnliche Effekte erreichen lassen wie in Transportprotein-transgenen Pflanzen.

Tatsächlich führte die Expression einiger der TGB-Sequenzen bzw. bestimmter Teilstücke davon in *Datura stramonium*-Pflanzen zu einer Beeinflussung der Virusinfektion (vgl. C 2.1.2. und C 2.1.3.).

##### 4.2.1. Das erste *Triple gene block*-Protein (P25)

Die Expression des ganzlängigen P25 und zwei N-terminal verkürzter Varianten über das pPVX P2A-System führte zu einer extremen Verstärkung der Symptombildung, die nach einiger Zeit sogar ein Absterben der infizierten Pflanzen zur Folge hatte. Die Expression zweier C-terminal verkürzter Varianten und einer Mutante mit Deletionen im N- und im C-Terminus schien dagegen keinen Einfluß auf den Ablauf der Virusinfektion zu haben. Hier zeigte sich ein für eine normale PVX-Infektion charakteristischer Phänotyp.

Die extreme Symptomverstärkung im Falle des ganzlängigen P25 könnte mit einem Phänomen erklärt werden, daß bereits im transgenen System beobachtet werden konnte. Hier zeigte es sich in einigen Fällen, daß die Inokulation von transgenen Pflanzen, die das unveränderte Transportprotein eines Virus exprimierten, mit dem Spendevirus nicht - wie vielleicht erwartet - zu einer Hemmung der Virusinfektion



führte, sondern daß im Gegenteil die Auswirkungen einer Infektion wesentlich verstärkt wurden. Dies konnte nicht nur für die Transportproteine des TMV und des BNYVV gezeigt werden (Cooper et al., 1995; Ziegler-Graff et al., 1991), sondern auch für das P25 des PVX. Ares et al. (1998) stellten fest, daß transgene *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, die das unveränderte P25 exprimierten, zwar resistent gegenüber den heterologen Tobamoviren TMV und Ob waren, daß aber nach Inokulation dieser Pflanzen mit dem homologen PVX deutlich heftigere Symptome auftraten als bei den entsprechenden Kontrollpflanzen. Die Symptomverstärkung äußerte sich in sehr starken ringförmigen Chlorosen, die an ihren Rändern in Nekrosen übergingen.

Dieses in transgenen *Nicotiana tabacum* beobachtete Symptombild zeigt deutliche Parallelen zu dem Phänotyp, der sich bei Infektion mit dem PVX-Vollängenklon, in den die Gensequenz des ganzlängigen P25 integriert wurde, in den *Datura stramonium*-Pflanzen ergab. Unterschiede in Symptomstärke und -ausprägung könnten auf generelle Unterschiede zwischen diesen beiden Pflanzenarten in der durch PVX verursachten Symptomatologie zurückzuführen sein. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen könnten - wie von Cooper et al. (1995) vermutet - darin bestehen, daß die Pflanze durch Expression des zusätzlichen Transportproteins gegenüber einer Virusinfektion anfälliger wird oder daß die Wirkung des natürlichen Transportproteins durch das zusätzlich exprimierte Protein verstärkt wird. Ares et al. (1998) schlagen vor, daß das P25 neben seiner Funktion als Transportprotein eine zusätzliche Rolle bei der Symptombildung spielen könnte. Diese Vermutung wird durch die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung unterstützt, daß auch die im N-terminalen Bereich verkürzten Teilstücke des P25 in den infizierten Pflanzen den gleichen Phänotyp verursachten wie das ganzlängige Protein. Durch die starke Verkürzung dieser Mutanten ist eine Beeinflussung des Infektionsverlaufs durch eine Unterstützung der Wirkung des natürlichen PVX-Transportproteins eher unwahrscheinlich. Dafür spricht auch, daß bei Expression der Mutante 25k 1-173, die von allen untersuchten Mutanten die geringsten Veränderungen aufwies (vgl. Abb. 21, C 2.1.2. a)) und deren Funktionalität damit am ehesten erhalten geblieben sein sollte, dieser symptomverstärkende Phänotyp nicht auftrat.

Auffällig ist, daß nur die P25-Varianten eine Symptomverstärkung verursachten, die den C-terminalen Bereich mit den beiden hierin enthaltenen Helikase-Motiven V und VI abdeckten. Alle übrigen Varianten, denen dieser Bereich fehlte, bewirkten keine Beeinträchtigung des Symptombildes. Durch eine Funktionsanalyse des P25 auf struktureller Ebene konnte gezeigt werden, daß dieses Protein sich in zwei funktionell unterschiedliche Subdomänen unterteilen läßt (Morozov et al., 1999b). Die erste Domäne umfasst die Helikase-Motive I bis IV im N-terminalen Bereich. Mit dieser Domäne konnten verschiedene, für den Zell-zu-Zell-Transport essentielle Funktionen in Verbindung gebracht werden. So besitzt sie neben der Fähigkeit RNA zu binden eine NTPase-Aktivität, die vermutlich für die Veränderung der Plasmodesmata-Struktur und/oder für den Transport zu oder durch die Plasmodesmata erforderlich ist. Außerdem scheint sie für den inter- und intrazellulären Transport des P25 zu spezifischen Zellkompartimenten verantwortlich zu sein. Die Funktion der zweiten, die Helikase-Motive V und VI umfassenden Domäne im C-terminalen Bereich ist dagegen weniger klar. Versuche mit chimären TGBp1-Proteinen deuten an, daß diese Domäne an spezifischen Interaktionen des P25 mit anderen viralen Proteinen, wie z.B. den ebenfalls TGB-kodierten Proteinen P12 und P8, beteiligt ist. Aufgrund der wenigen bisher zur Verfügung stehenden Informationen hinsichtlich der genauen Funktion dieser Domäne wäre es durchaus denkbar, daß diese weitere Funktionen besitzt.

Malcuit et al. (1999) konnten kürzlich nachweisen, daß in Kartoffelpflanzen, die das natürlicherweise in Kartoffeln vorkommende Resistenzgen Nb tragen, die bei einer

PVX-Infektion eintretende Hypersensitivitätsreaktion durch das P25 ausgelöst wird. Damit scheint tatsächlich eine gewisse Verbindung zwischen dem P25 und den das Symptombild bestimmenden Mechanismen zu bestehen. Folglich könnte es durchaus möglich sein, daß die C-terminale Subdomäne des P25 auf eine bisher unbekannte Weise an der Ausprägung des Symptombildes beteiligt ist.

#### 4.2.2. Das zweite *Triple gene block*-Protein (P12)

Im Gegensatz zu der symptomverstärkenden Wirkung des P25 und seiner Derivate konnten für das zweite TGB-Protein P12 ganz andere Effekte beobachtet werden (vgl. C 2.1.2.). Während bei Expression der N- bzw. C-terminal verkürzten P12-Varianten keine Unterschiede zu einer normalen PVX-Infektion auftraten, führte die Expression des ganzlängigen P12 zu einer verzögert eintretenden Infektion mit sehr mildem Verlauf und späterer Erholung (*recovery*) der Pflanze. Die Viruskonzentration in den infizierten Blättern war äußerst gering. Die Überexpression des ganzlängigen P12 wirkte sich damit offensichtlich hemmend auf die durch das PVX verursachte Infektion aus.

Ähnliche Beobachtungen konnten Seppänen et al. (1997) in transgenen Pflanzen für Mutanten des P12 machen, in die zwischen hydrophobem Transmembransegment und konservierter hydrophiler Region verschiedene Linker eingebracht worden waren. Die veränderten P12-Gensequenzen wurden in Kombination mit der überlappenden P8-Wildtyp-Gensequenz in Kartoffelpflanzen transformiert. Die transgenen Pflanzen erwiesen sich als resistent gegenüber PVX und den heterologen Viren *Potato aucuba mosaic virus*, *Potato virus M* und *Potato virus S*. Transgene Pflanzen, die ausgehend von einer bicistronischen mRNA gleichzeitig die Wildtyp-Sequenzen des P12 und des P8 exprimierten, zeigten dagegen eine normale Anfälligkeit gegenüber den genannten Viren. Ein vergleichbarer Ansatz mit dem TGBp2 eines anderen Potexvirus, dem WCIMV, führte zu den gleichen Erkenntnissen (Beck et al., 1994). Eine Resistenzwirkung konnte nur in den Pflanzen beobachtet werden, die ein mutiertes TGBp2, auch hier neben dem Wildtyp TGBp3, exprimierten. Zu anderen Ergebnissen kam dagegen die Arbeitsgruppe um Kobayashi et al. (2001). In transgenen *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, die die unveränderte PVX P12-Sequenz exprimierten, verursachte eine Infektion mit PVX ein sehr ungewöhnliches Symptombild, das gewisse Gemeinsamkeiten mit einer milden Form einer Hypersensitivitätsreaktion aufwies. Auf inokulierten sowie systemisch infizierten Blättern der inokulierten Pflanzen bildeten sich ringförmige Läsionen aus, die durch nekrotische Bereiche begrenzt wurden. Ein ähnliche Veränderung in der Symptomatik, allerdings mit einer wesentlich stärkeren Ausprägung der Symptome, konnten - wie bereits erwähnt - Ares et al. (1998) bei PVX-Infektion transgener Pflanzen, die die unveränderte Sequenz des P25 exprimierten, beobachten. Als Ursache für die Diskrepanz zwischen den von Seppänen et al. (1997) und Kobayashi et al. (2001) gewonnenen Erkenntnisse über die Resistenzwirkung des unveränderten P12 führen letztgenannte die unterschiedliche Art der Expression in den transgenen Pflanzen an. Während das Wildtyp-P12 in den von Seppänen et al. (1997) verwendeten Pflanzen von einer bicistronischen mRNA exprimiert wurde, die auch die Sequenz für das P8 enthielt und somit eine Expression beider Sequenzen zu gleichen Teilen ermöglichen sollte, wurde in den Pflanzen von Kobayashi et al. (2001) das P12 allein exprimiert. Bei Potexviren werden unter normalen Umständen die TGB-Proteine 2 und 3 nur zu sehr geringen Mengen in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis zueinander gebildet (Verchot et al., 1998). Ein Ungleichgewicht des P12/P8-Verhältnisses, wie es bei alleiniger Überexpression des P12 in transgenen Pflanzen während einer PVX-Infektion entsteht, könnte möglicherweise zu dem von Kobayashi et al. (2001) beobachteten Phänotyp geführt haben.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wäre für das über pPVX P2A exprimierte ganzlängige P12 eigentlich ein ähnlicher Phänotyp zu erwarten gewesen wie in den transgenen Pflanzen von Kobayashi et al. (2001). Die beobachtete Hemmwirkung des über den Vollängenklon exprimierten P12 steht vermutlich ebenfalls mit der gewählten Expressionsstrategie in Zusammenhang. Wie bereits erwähnt, tragen alle über pPVX P2A exprimierten Proteine aufgrund des anhängenden P2A-Oligopeptids 19 zusätzliche Aminosäuren an ihrem C-Terminus. Es wäre möglich, daß diese Sequenz die Struktur des P12 so verändert, daß es seine eigentliche Funktion nicht mehr erfüllen kann. Somit würde über das pPVX P2A-System in diesem Fall eine dysfunktionelle Mutante exprimiert werden, die die natürliche Funktion des nativen P12 dahingehend beeinflussen kann, daß sich ein resistenter Phänotyp in den PVX-infizierten Pflanzen ergibt. Bestätigt werden könnte diese Vermutung durch die Herstellung P12-transgener Pflanzen mit und ohne anhängende P2A-Sequenz.

#### **4.2.3. Das dritte *Triple gene block*-Protein (P8)**

Bei Expression verschiedener Bereiche des dritten TGB-Proteins P8 über das pPVX P2A-System konnten sehr interessante Beobachtungen gemacht werden (vgl. C 2.1.3.). Während das ganzlängige P8 keine Auswirkungen auf den Verlauf der PVX-Infektion hatte, führte die Expression bestimmter C-terminal verkürzter Varianten in den infizierten Pflanzen zu einer starken Einschränkung der Virusinfektion. Im Extremfall entwickelten sich lediglich einige wenige punktförmige Nekrosen auf den inokulierten Blättern. Die Größe dieser Nekrosen erreichte maximal einen Durchmesser von ca. 2 mm und ihre Anzahl blieb über den gesamten Infektionszeitraum konstant. Zu einem späten Zeitpunkt der Infektion konnten in den meisten Fällen auch auf den systemisch infizierten Blättern wenige nekrotische Läsionen beobachtet werden. Virus konnte nur in den punktförmigen Nekrosen in sehr geringe Mengen detektiert werden. In symptomfreiem Gewebe konnte kein Virus nachgewiesen werden.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß durch die Expression dieser P8-Teilstücke eine effektive Ausbreitung des PVX verhindert wurde. Das Virus schien zwar in der erstinfizierten Zelle replizieren zu können, doch die für die Etablierung einer normalen Infektion notwendige, schnelle Ausweitung der Infektion auf benachbarte Zellen war offenbar stark eingeschränkt. Die infizierten Zellen starben ab, bevor das Virus das umliegende Gewebe ausreichend infizieren konnte. Ein Langstrecken-Transport des Virus schien dagegen im gewissen Maße möglich gewesen zu sein, da in den meisten Fällen nach einiger Zeit auch systemisch nekrotische Symptome zu beobachten waren.

Eine Resistenzwirkung trat nur bei Sequenzen auf, die C-terminale Verkürzungen bis zu einem bestimmten Bereich innerhalb der zwischen allen Potexviren konservierten Region im mittleren Teil des PVX-TGBp3 aufwiesen (vgl. C 2.1.3., Abb. 22). Der für die Auslösung des Hemmeffektes kritische Bereich lag zwischen den Aminosäuren 40-42 der P8-Sequenz. Eine Über- bzw. Unterschreitung dieser Grenze um nur eine einzige Aminosäure ließ das Symptombild in das vollkommene Gegenteil umschlagen. Statt einer Hemmung der Virusinfektion bewirkte die Expression dieser Teilstücke eine extreme Symptomverstärkung, die nach einiger Zeit zum Absterben der infizierten Pflanzen führte. Eine zusätzliche Deletion von 6 Aminosäuren am N-Terminus weitete dagegen die antivirale Wirkung auf P8-Varianten aus, die geringere C-terminale Verkürzungen aufwiesen als solche mit vollständigem N-Terminus. Allerdings war der zu beobachtende Hemmeffekt in diesen Fällen weniger stark.

Interessant war zudem, daß sich ähnliche Effekte auch durch die Expression heterologer Sequenzen erreichen ließen (vgl. C 2.1.7.). Durch die Expression des ganzlängigen TGBp3-Proteins P10 aus dem *Cymbidium mosaic potexvirus* (CymMV) ergab sich ein ähnlicher Phänotyp wie bei einigen der C-terminal verkürzten PVX P8-Sequenzen. Auch hier konnte eine deutliche Einschränkung der Virusausbreitung beobachtet werden, die sich in punktförmigen Nekrosen auf inokulierten und systemisch infizierten Blättern äußerte. Eine C-terminal verkürzte Variante verursachte eine extreme Symptomverstärkung, wie sie bei verschiedenen PVX P8-Varianten ebenfalls zu beobachten war. Wie beim PVX P8 wirkte sich die Expression einer N-terminal verkürzten Mutante nicht auf die Virusinfektion aus. Die Fähigkeit, die beobachteten Effekte auszulösen, schien damit generell in diesen Sequenzen vorhanden zu sein.

Die Interpretation der beobachteten Phänomene sowie die Ermittlung von möglichen Ursachen hierfür gestalten sich sehr schwierig, da bisher weder für das P8 des PVX noch für die TGBp3-Proteine anderer Viren ausreichend Informationen über Funktion und Aufgabe dieser Proteine zur Verfügung stehen. Ihre Beteiligung am Zell-zu-Zell-Transport ist unumstritten, ihre absolute Notwendigkeit hierfür allerdings fraglich. Erst kürzlich konnten Tamai and Meshi (2001) nachweisen, daß eine Mutante eines PVX-Vollängenkons mit inaktiviertem P8 trotz des fehlenden TGB-Proteins in der Lage war, zu einem geringen Maß von Zelle zu Zelle gelangen. Durch gleichzeitige Überexpression des zweiten TGB-Proteins P12 konnte die Transportdefizienz dieser Mutante allerdings nahezu vollständig behoben werden. Aus diesen Beobachtungen schlossen Tamai and Meshi (2001), daß das P8 für den eigentliche Prozeß des Zell-zu-Zell-Transports nicht unbedingt erforderlich ist, daß es aber die Effizienz dieses Vorgangs erheblich erhöhen kann.

Untersuchungen von Solovyev et al. (2000) deuten darauf hin, daß die subzelluläre Lokalisierung des P12 wesentlich durch das P8 bestimmt wird (vgl. A 3.2.). Die mit Hilfe fluoreszenzmarkierter TGB-Proteine gewonnenen Erkenntnisse lassen vermuten, daß das P8 möglicherweise einen zelleigenen Translokationsmechanismus aktiviert, über den der intrazelluläre Transport des membrangebundenen P12 zur Zellperipherie erfolgt.

Eine Möglichkeit für die Wirkungsweise der den Hemmeffekt auslösenden P8-Teilstücke könnte folglich in der Störung des intrazellulären Transports des P12 bestehen. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurde in Anlehnung an die von Solovyev et al. (2000) durchgeführten Versuche die Fähigkeit einiger bestimmter P8-Teilstücke, den intrazellulären Transport des TGBp2 zu vermitteln, untersucht (vgl. C 2.1.4.). In einem ersten Ansatz wurden diese Teilstücke zum einen gemeinsam mit dem homologen P12 aus PVX und zum anderen mit dem heterologen TGBp2 aus PSLV exprimiert (vgl. C 2.1.4. a)). Im homologen System erwiesen sich alle Varianten als fähig, die Translokation des P12 zu vermitteln. Die Verkürzungen scheinen damit keinen Einfluß auf diese Funktion des P8 auszuüben. In Kombination mit dem heterologen PSLV-TGBp2 konnte dagegen allenfalls ein teilweiser Transport des TGBp2 beobachtet werden. Darüberhinaus zeigte sich das P8-Teilstück px 8k 1-42, welches sich im pPVX P2A-System als die Variante mit dem höchsten resistenzauslösenden Potential erwiesen hatte, nicht dazu in der Lage, eine Translokation des PSLV-TGBp2 zu vermitteln. Da bei Expression verschiedener, wesentlich stärker verkürzter Varianten wiederum eine Translokation zu beobachten war, konnte dieser Effekt nicht auf einen generellen Funktionsverlust aufgrund zu starker Verkürzung der P8-Sequenz zurückzuführen sein. Im heterologen System war damit eine mehr oder minder starke Einschränkung der Funktionsfähigkeit des P8 mit den vorgenommenen C-terminalen Deletionen verbunden. Da sich diese Einschränkung aber nur bei Verwendung des heterologen TGBp2 bemerkbar machte,

im Falle der Expression über pPVX P2A aber ein homologes System vorlag, konnte aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß die im pPVX P2A-System beobachtete Resistenzwirkung nicht in einem Funktionsverlust der hemmenden Sequenzen und einer daraus resultierenden Störung des normalen Ablaufs des intrazellulären Transports erklärt werden konnte. Unterstützt wurde diese Vermutung durch die Ergebnisse weiterer Versuche, in denen die verschiedenen P8-Teilstücke auf unterschiedliche Weise zusammen mit den nativen Sequenzen des TGBp2 und 3 aus PVX und PSLV exprimiert wurden (vgl. C 2.1.4. b) und c)). Auch hier konnte keine Beeinflussung der Lokalisation der nativen TGB-Proteine durch die verkürzten Varianten beobachtet werden.

Der Einfluß der verkürzten P8-Teilstücke auf andere Bereiche des intrazellulären Transports und auf den interzellulären Transport konnte in dieser Arbeit leider nicht näher untersucht werden. Möglicherweise ist der Hemmeffekt auf eine Störung anderer für den Zell-zu-Zell-Transport wichtiger Prozesse zurückzuführen. In einem von Lough et al. (1998) entwickelten, aktuellen Modell des Zell-zu-Zell-Transport bei Potexviren wird vorgeschlagen, daß eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen dem aus TGBp1, viraler RNA und Hüllprotein gebildeten RNP-Komplex und den TGB-Proteinen TGBp2 und 3 besteht, die dafür sorgt, daß der RNP-Komplex zu den Plasmodesmata dirigiert und an ein putatives Plasmodesmata-Dockingprotein übergeben wird. Hieraus ergeben sich eine Vielzahl von Möglichkeiten, in denen sich ein dysfunktionelles TGBp3-Protein störend auf den normalen Ablauf des Zell-zu-Zell-Transports auswirken könnte.

Eine weitere Möglichkeit für die Wirkungsweise der hemmende P8-Teilstücke stellte schließlich die Auslösung einer Hypersensitivitätsreaktion (HR) in den mit den entsprechenden pPVX P2A px 8k-Konstrukten infizierten Pflanzen dar. Kobayashi et al. (2001) konnten für transgene *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, die das unveränderte P12 aus PVX exprimierten, zeigen, daß eine Infektion mit PVX in diesen Pflanzen zu Symptomen und physiologischen Veränderungen führte, die auf eine leichte Form einer HR hindeuteten. Diese Beobachtungen veranlassten sie zu der Annahme, daß die hier vorliegende Resistenz nicht nur auf eine Beschränkung des Virustransports zurückzuführen war, sondern daß auch die Induktion von Genen, die am Prozeß der pflanzen-eigenen Pathogenabwehr beteiligt sind, eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung der Resistenz spielen könnte.

Durch Expression verschiedener relevanter P8-Teilstücke nach Agroinfektion konnte zwar ausgeschlossen werden, daß die P8-Sequenzen an sich eine toxische Wirkung auf die agroinfizierte Pflanze haben (vgl. C 2.1.5.). Dennoch besteht durchaus die Möglichkeit, daß die bei Expression der verschiedenen P8-Sequenzen über pPVX P2A entstehenden Symptombilder das Resultat einer Hypersensitivitätsreaktion durch das pflanzeigene Abwehrsystem waren.

## **5. Ermittlung des antiviralen Potentials von viralen Hüllproteingenen in einem homologen Testsystem**

Als Testsequenzen mit möglicher antiviraler Wirkung bieten sich virale Hüllproteingene an, da ihr resistenzerzeugendes Potential in transgenen Systemen bereits für eine Vielzahl verschiedener Viren nachgewiesen werden konnte. Hierbei ist besonders interessant, daß in einigen Fällen eine Hüllprotein-vermittelte Resistenz nicht nur gegenüber dem Spendervirus bzw. mit diesem Virus sehr nah verwandten Stämmen beobachtet werden konnte, sondern daß sich der virushemmende Effekt auch auf

entfernter verwandte Viren auswirkte. Vor allem für Vertreter der Potyviren wurde über zahlreiche Beispiele für solche artübergreifenden Resistenzen berichtet. So zeigten erstmals Stark and Beachy (1989), daß *Soybean mosaic virus* (SMV)-Hüllprotein transgene Pflanzen nicht nur gegenüber SMV selbst, sondern auch gegen zwei andere Potyviren, TEV und PVY, resistent waren. Weitere, von Namba et al. (1992) beschriebene Beispiele sind die durch Hüllproteine des *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) bzw. des *Watermelon mosaic virus II* (WMV II) in transgenen Pflanzen erzeugten Resistenzen gegenüber sechs anderen Potyviren - darunter ebenfalls TEV und PVY.

Zur Klärung der Frage, ob sich mit Hilfe der beiden zur Verfügung stehenden viralen Vollängenkclone pPVX P2A Ascl und pTEV H/C Ascl ähnliche Effekte erzielen lassen, wurden in diese cDNA-Klone die Hüllproteingensequenzen des CIYVV, des CymMV, des PVX, des PVY, des TEV, des TRV ON und des TRV ORY eingebaut.

Im Falle der Expression von PVX-Hüllproteinsequenzen über pPVX P2A Ascl wurde nicht nur das ganzlängige Hüllproteingen verwendet, sondern auch die kodierenden Sequenzen für eine Reihe weiterer, N-terminal verkürzter Mutanten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind gesondert unter C 2.1.8. beschrieben.

Die Ergebnisse zu den übrigen pPVX P2A-Konstrukten befinden sich unter C 2.2..

Ergebnisse zu den auf pTEV H/C-basierenden Konstrukten sind in C 3. dargestellt. Leider konnte ein TEV-Vollängenklon mit integrierter TEV-Hüllproteingensequenz nicht erzeugt werden. Der Versuch, das Hüllproteingen des TEV in pTEV H/C Ascl zu integrieren, schlug trotz zahlreicher Ansätze fehl. In den transformierten Bakterienzellen konnten einzig stark deletierte Derivate detektiert werden, die vermutlich durch Rekombinationsereignisse zwischen den homologen Bereichen des TEV-Hüllproteingens und entsprechenden Bereichen der TEV-Sequenz entstanden sind. Aus diesem Grund wurde eine Resistenzwirkung des homologen Hüllproteins gegenüber TEV nicht untersucht.

Infektionsversuche auf *N. benthamiana* bzw. *Datura stramonium* zeigten, daß für keine der verwendeten Hüllproteinsequenzen ein antiviraler Effekt gegenüber den exprimierenden Viren TEV und PVX festgestellt werden konnte. In allen mit den verschiedenen Konstrukten infizierten Pflanzen entwickelten sich innerhalb eines normalen Zeitraums die für das jeweilige Virus typischen Symptome.

Diese Ergebnisse mögen für Hüllproteine nicht verwandter Virusarten zu erwarten gewesen sein. Im Falle der homologen Sequenz und der eng verwandten Vertreter stellt sich dagegen die Frage, aus welchem Grund keinerlei Effekte auf die Virusvermehrung und -ausbreitung beobachtet werden konnten. Liegen die Ursachen dafür in einem generell fehlenden antiviralen Potential dieser Sequenzen gegenüber dem exprimierenden Virus oder könnte die Art der Expression über die viralen Vollängenkclone für das Ausbleiben eines eventuell vorhandenen virushemmenden Effekts verantwortlich sein? In Bezug auf den letztgenannten Punkt spielt vor allen Dingen der Mechanismus einer Hüllprotein-vermittelten Resistenz eine entscheidende Rolle.

Zahlreiche Untersuchungen zum Mechanismus der Hüllprotein-vermittelten Resistenz zeigen auf, daß diesem Phänomen kein allgemeingültiges Prinzip zugrunde liegt, sondern vielmehr individuell für einzelne Viren bzw. Virusgenera betrachtet werden muß (Hackland et al., 1994). So weisen viele der bisher gewonnenen Erkenntnisse über durch potyvirale Hüllproteine vermittelte Resistenzen darauf hin, daß es sich hierbei um einen RNA-vermittelten Mechanismus handelt. Dies konnte - meist durch Verwendung

von nicht-translatierbaren Sequenzen - zum Beispiel für die Hüllproteine des TEV (Goodwin, et al., 1996; Lindbo and Dougherty, 1992; Lindbo et al., 1993; Silva-Rosales et al., 1994) und des PVY (Farinelli and Malnoë, 1993; Smith et al., 1994; van der Vlugt et al., 1992) gezeigt werden.

Bei über das pTEV H/C-System exprimierten Sequenzen ergibt sich ein Problem, das generell bei der Verwendung von potyviralen cDNA-Klonen als Expressionssysteme auftritt. Aufgrund der Expression der viralen Sequenz als Polyprotein, welches erst nach erfolgter Translation durch die Aktivität viruskodierter Proteasen in Einzelproteine prozessiert wird, erfolgt auch die Transkription der mRNA in Form einer das gesamte Virusgenom umfassenden Poly-mRNA. Eine eigenständige mRNA, die nur den Bereich der Fremdsequenz umfasst, liegt somit nicht vor.

Im allgemeinen hat dieser Aspekt keine signifikanten Auswirkungen auf die Nutzbarkeit solcher Vollängenklonen zur Expression von Fremdsequenzen. Spielt aber, wie in diesem Fall, die mRNA und nicht das Protein die entscheidende Rolle, erweisen sich diese Konstrukte als ungeeignet. Die Transkription in Form einer Poly-mRNA führt mit hoher Wahrscheinlichkeit dazu, daß ein auf RNA-Ebene ablaufender Mechanismus nicht mehr erfolgen kann. Die Erzeugung einer RNA-vermittelten Resistenz durch Expression antiviraler Fremdsequenzen über einen potyviralen Vollängenklon wäre damit nicht realisierbar.

Neben einer generellen Unfähigkeit der untersuchten Fremdsequenzen zur Resistenz-erzeugung gegenüber TEV wäre dies ein möglicher Erklärungsansatz für das Ausbleiben von hemmenden Effekten bei der Expression der Hüllproteine der Potyviren CIYVV und PVY über pTEV H/C Ascl.

Im Gegensatz zu den durch potyvirale Hüllproteine vermittelten Resistenzen spielt bei der durch das PVX-Hüllprotein vermittelten Resistenz nach bisherigen Erkenntnissen das Protein selbst die entscheidende Rolle (vgl. A 3.3.3.), so daß sich dieser Effekt prinzipiell auch mit Hilfe des pPVX P2A-Systems erzeugen lassen sollte. Daß dennoch weder für das ganzlängige Hüllprotein noch für die verkürzten Varianten eine hemmende Wirkung gegenüber PVX beobachtet werden konnte, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das zusätzlich exprimierte PVX-Hüllprotein in der infizierten Zelle erst zu einem relativ späten Zeitpunkt in größeren Mengen zur Verfügung stand. Liegt die Hauptwirkung des überexprimierten PVX-Hüllproteins - wie von Spillane et al. (1997) angenommen - aber in der Beeinflussung von relativ frühen Ereignissen der Virusinfektion, so wird zu diesem Zeitpunkt vermutlich noch nicht ausreichend zusätzliches PVX-Hüllprotein vorhanden gewesen sein, um einen tatsächlichen Effekt hervorrufen zu können. Diese Vermutung wird auch durch die von Hemenway et al. (1988) in transgenen Pflanzen beobachtete Abhängigkeit der Resistenzausprägung von der Menge an exprimiertem Hüllprotein gestützt (vgl. A 3.3.3.).

Als weitere Ursache kann auch ein negativer Einfluß des P2A-Oligopeptids, welches den über pPVX P2A exprimierten, zusätzlichen PVX-Hüllproteinsequenzen anhängt, nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß das Ausbleiben eines antiviralen Effekts der verschiedenen Hüllproteine gegenüber den exprimierenden Viren PVX und TEV nicht grundsätzlich auf ein fehlendes antivirales Potential dieser Sequenzen schließen läßt. Vielmehr scheint die Art der Expression über die verwendeten viralen Vollängenklone für die Ermittlung von Hüllprotein-vermittelten Resistenzen aus verschiedenen, systembedingten Gründen eher ungeeignet zu sein.

Die Anwendbarkeit viraler Vollängenklone in diesem Bereich wird zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal ausführlicher diskutiert (vgl. D 8.).

## 6. Bildung von virusähnlichen Partikeln durch über virale Vollängenklone exprimierte Hüllproteine verschiedener Viren

Die Analyse des Mechanismus, nach dem eine Aggregation viraler Hüllproteine zu Viruspartikeln erfolgt, ist schon seit geraumer Zeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Erste Einblicke konnten mit Hilfe von *in vitro*-Studien anhand von aus virusinfizierten Pflanzen aufgereinigten Partikeln gewonnen werden (Bol et al., 1974; Fraenkel-Conrat and Williams, 1955; Hull, 1970; McDonald et al., 1977; McDonald and Bancroft, 1977). Diese Vorgehensweise erlaubte allerdings lediglich die Untersuchung an intakten bzw. durch Proteaseabbau verkürzten Hüllproteinen.

Eine gezielte Analyse funktionsrelevanter Bereiche wurde erst durch die Expression von mutierten Hüllproteinsequenzen in heterologen Systemen möglich. Als einfaches und schnelles Expressionssystem wurde hier vornehmlich *Escherichia coli* gewählt (Hwang et al. 1994; Jagadish et al., 1993; Stram et al., 1993; Yusibov et al., 1996; Zhao et al., 1995). Aber auch Insektenzellen (Bertioli et al., 1991; Edwards et al., 1994; Shanks and Lomonosoff, 2000; Singh et al., 1995) und Hefen (Jagadish et al., 1991) eignen sich als heterologe Systeme zum Studium der Aggregation von Hüllproteinen.

Alle bisher genannten Ansätze haben allerdings den Nachteil, daß es sich um eine Partikelbildung unter sehr artifiziellen Bedingungen handelt. In einer Pflanze, dem natürlichen Ort der Assemblierung, könnten gänzlich andere biochemische und physiologische Voraussetzungen gegeben sein, die unabdingbar für eine erfolgreiche Aggregation zu Partikeln bzw. virusähnlichen Partikeln sind und die ein heterologes System in dieser Weise nicht bieten kann. Eine Alternative hierzu bildet die Verwendung Hüllprotein-transgener Pflanzen (Bertioli et al., 1991; Bragard et al., 2000; Nida et al., 1992; Sleat et al., 1989). Dieses System erlaubt eine Untersuchung der VLP-Bildung unter nahezu natürlichen Bedingungen und gewährt damit einen wirklichkeitsgetreueren Einblick in den Mechanismus dieses Vorgangs, als dieses z.B. mit Hilfe bakterieller Systeme möglich ist. Der Nachteil besteht hier allerdings in der sehr zeitaufwendigen und arbeitsintensiven Herstellung der transgenen Pflanze, wodurch die Kapazitäten im Hinblick auf die Anzahl zu testender Hüllproteinsequenzen stark eingeschränkt werden.

Der Anforderung, eine Bildung virusähnlicher Partikel unter nahezu natürlichen Bedingungen zu gewährleisten und dennoch Ergebnisse ohne großen Aufwand innerhalb von kurzer Zeit zu liefern, werden dagegen virale Vollängenklone gerecht. Durch ihre einfache Handhabbarkeit und ihre universelle Einsetzbarkeit bilden sie die ideale Grundlage für ein zuverlässiges System zur Funktionsanalyse viraler Hüllproteine. Dieses kann entweder auf die Art und Weise geschehen, daß das Hüllprotein des viralen Vollängenklons selbst Gegenstand der Untersuchung ist (Fedorkin et al., 2001; Santa Cruz et al., 1998) oder daß die Hüllproteine anderer Viren über ein virales System exprimiert und auf ihre Fähigkeit zur Aggregation hin untersucht werden. So ist es z.B. O'Brien et al. (2000) gelungen, mit Hilfe eines auf PVX-basierenden Vollängenklons das VP6-Hüllprotein des humanpathogenen Rotavirus in Pflanzen zu exprimieren und seine Aggregation zu icosahedrischen virusähnlichen Partikeln nachzuweisen. Ähnliche Ergebnisse sollten sich daher auch mit Hüllproteinen phytopathogener Viren erreichen lassen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe einer immunoelektronenmikroskopischen Untersuchung von Pflanzen, in denen über den viralen Vollängenklon pPVX P2A AscI die Hüllproteine verschiedener Viren exprimiert wurden, gezeigt werden, daß in einigen Fällen virusähnliche Partikel durch die exprimierten ‚Fremd‘-Hüllproteine gebildet



werden. Eine VLP-Bildung konnte mit den Hüllproteinen des PVY, des TEV, des TRV ON und des TRV ORY beobachtet werden (vgl. C 4.1.).

Das Ausbleiben der VLP-Bildung im Falle der Hüllproteine zweier weiterer Viren - des CIYVV und des CymMV - war wahrscheinlich auf die Unfähigkeit der exprimierten Proteine zur Aggregation zurückzuführen, da in der Western-Analyse eine ausreichende Menge an Hüllprotein nachgewiesen werden konnte (vgl. C 4.1.). Ein Grund für diese Unfähigkeit könnte darin liegen, daß neben den Hüllproteinsequenzen weitere Faktoren notwendig sind, um eine Aggregation zu initiieren. Beispiele hierfür sind das Benyvirus *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) und das Pomovirus *Potato mop-top virus* (PMTV), die neben der Hüllproteinsequenz die Anwesenheit geringer Mengen eines sogenannten CP-readthrough-Proteins, welches durch Überlesen des das Hüllprotein abschließenden Stopcodons entsteht, für eine erfolgreiche Enkapsidierung der viralen RNA benötigen (Schmitt et al., 1992; Bragard et al., 2000). Möglich wäre auch, daß die RNA der Viren, aus denen die untersuchten Hüllproteine stammen, eine Rolle bei der Assemblierung spielt. Daß diese in dem verwendeten Testsystem nicht zur Verfügung stand, könnte sich ebenfalls negativ auf die Fähigkeit zur Aggregation auswirken. Hieran wird eine generelle Schwierigkeit bei der Untersuchung der Partikelbildungsfähigkeit viraler Hüllproteine außerhalb des natürlichen Kontextes deutlich: Selbst wenn mit Hilfe von viralen Vollängenklonen eine Expression in einem für eine Partikelbildung natürlichen, pflanzlichen System ermöglicht wird, können bei der Verwendung heterologer Hüllproteine lediglich annähernd natürliche Bedingungen geschaffen werden, da wichtige durch die Organisation des Virus, aus dem das untersuchte Hüllprotein stammt, bestimmte Faktoren fehlen können.

Desweiteren kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich die dem C-Terminus der Hüllproteinsequenzen anhängenden 19 Aminosäuren des P2A negativ auf die Fähigkeit der CIYVV- bzw. CymMV-Hüllproteine zur Aggregation auswirkten und es deshalb nicht zu einer Aggregation kam.

Ähnliche Ursachen muß auch das Ausbleiben der VLP-Bildung im Falle der über pTEV H/C Ascl exprimierten Hüllproteine verschiedener Viren haben. Keines der über diesen Vollängenklon exprimierten Hüllproteine schien in der Lage zu sein, zu virusähnlichen Partikeln zu aggregieren (vgl. C 4.3.). Obwohl mit Hilfe des pPVX P2A-Systems bereits gezeigt werden konnte, daß dieses zumindest für die Hüllproteine PVY, TRV ON und TRV ORY möglich sein müßte.

Die Erklärung für diese Diskrepanz liegt hier möglicherweise in einer durch die Umstände der Expression bedingten Unfähigkeit dieser Proteine zur Aggregation. Durch die zusätzlichen Sequenzen, die prinzipbedingt an den über pTEV H/C exprimierten Hüllproteinen am C- und am N-Terminus verbleiben (vgl. B 2.6.2. e)), könnte eine Bildung von virusähnlichen Partikeln verhindert werden. Um die Richtigkeit dieser Vermutung zu bestätigen, wurde über pPVX P2A Ascl eine auf dem TRV ON-Hüllprotein basierende Sequenz exprimiert, die an ihrem 5'-Ende zusätzlich die kodierende Sequenz für eben die Aminosäuren trug, die auch bei der Prozessierung des chimären TEV-Polypeptids am N-Terminus des über pTEV H/C exprimierten Hüllproteins verbleiben. Bei Expression sollte nun ein chimäres TRV ON-Hüllprotein mit 11 zusätzlichen, aus pTEV H/C Ascl stammenden Aminosäuren am N-Terminus und 19 C-terminal anhängenden Aminosäuren des P2A aus pPVX P2A Ascl entstehen, so daß eine ähnliche Situation gegeben sein sollte wie bei dem über pTEV H/C Ascl exprimierten TRV ON-Hüllprotein. Eine immunoelektronenmikroskopische Analyse zeigte allerdings, daß diese TRV ON-Hüllprotein-Variante überraschenderweise sehr wohl befähigt war, zu VLPs zu aggregieren (vgl. C 4.3.2.). Das Vorhandensein von zusätzlichen N- und C-terminalen Sequenzen an sich schien damit die VLP-Bildungs-

fähigkeit des TRV-Hüllproteins nicht zu beeinflussen. Der einzige Unterschied der über pPVX P2A exprimierten Variante zu dem über pTEV H/C Ascl gebildeten TRV ON-Hüllprotein lag in der Zusammensetzung der C-terminal anhängenden Sequenz. Folglich scheint nicht die Tatsache, daß den exprimierten Hüllproteinen zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus anhängen, eine Rolle zu spielen, sondern die Zusammensetzung dieser Sequenz scheint entscheidend zu sein. Eine Überprüfung dieses Kriteriums ließ sich mit den zur Verfügung stehenden Mitteln allerdings nicht ohne weiteres bewerkstelligen, so daß diese Vermutung ohne nähere Untersuchungen für am wahrscheinlichsten angenommen wurde.

## **7. Bildung von virusähnlichen Partikeln durch veränderte Hüllproteine verschiedener Tobra- und Potyviren nach Expression über pPVX P2A Ascl**

Nachdem sich die über das pPVX P2A-System exprimierten ganzlängigen Hüllproteine der Viren PVY, TEV, TRV ON und TRV ORY dazu in der Lage zeigten, in infizierten Pflanzen zu virusähnlichen Partikeln zu aggregieren, wurde durch sukzessive Verkürzung terminaler Bereiche sowie durch Austausch bestimmter Aminosäuren untersucht, welche Regionen dieser Proteine für eine Partikelbildung von Bedeutung sind. Desweiteren sollte ein Vergleich der Ergebnisse zwischen den Vertretern einer Virusgruppe Auskunft über mögliche Unterschiede in den Anforderungen des einzelnen Virus hinsichtlich der für eine Aggregation notwendigen Sequenzen geben.

### **7.1. Bildung von virusähnlichen Partikeln durch verschieden verkürzte und veränderte Hüllproteine der Tobraviren TRV ON und TRV ORY**

Bisher ist nur recht wenig bekannt über die tatsächliche Struktur und Organisation des Hüllproteins innerhalb eines Tobravirus-Partikels. Die wenigen Erkenntnisse, die Auskunft über für die Partikelbildung essentielle Sequenzbereiche geben könnten, leiten sich von indirekten Ansätzen wie Sequenzvergleichen (Goulden et al., 1992), Bindungsstudien unter Verwendung monoklonaler Antikörper (Legorburu et al., 1995) oder strukturellen Untersuchungen anhand der Magnetischen Kernresonanzspektroskopie (NMR; Mayo et al., 1993) ab. Von grundlegender Bedeutung für die Erforschung des Partikelbaus von Tobraviren sind vergleichende Ansätze, die das fundierte Wissen über die Struktur eines anderen Virus mit stäbchenförmigen Partikeln - dem *Tobacco mosaic virus* (TMV) - nutzen.

TMV dient als klassisches Forschungsobjekt für die Untersuchung der molekularen Anatomie von Viren mit stäbchenförmigen Partikeln. Mit Hilfe der Röntgenkristallographie konnten bereits 1978 von Bloomer et al. Struktur und Interaktion einzelner TMV Hüllprotein-Untereinheiten innerhalb einer aus 34 Untereinheiten bestehenden Partikelkomponente detailliert dargestellt werden. Der Aufbau der TMV-Partikel selbst konnte schließlich von Namba et al. (1989) mittels Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden. Zusätzlich trugen vergleichende Analysen zwischen verschiedenen Tobamoviren dazu bei, detaillierte Erkenntnisse über die mögliche Funktion verschiedener konservierter Aminosäuren innerhalb einer Hüllprotein-Untereinheit zu gewinnen, wobei die Lage der einzelnen Aminosäuren im gefalteten Molekül das entscheidende Kriterium für die Zuschreibung der jeweiligen Funktion bildete (Altschuh et al., 1987).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine verschiedener Vertreter der Tobamo- und Tobraviren zeigt, daß zahlreiche innerhalb der Tobamogruppe konservierte Aminosäuren auch in den Hüllproteinsequenzen verschiedener Tobraviren

zu finden sind (Goulden et al., 1992). Einige dieser Aminosäuren erweisen sich auch im Vergleich der Hüllproteinsequenzen weiterer Viren mit stäbchenförmigen Partikeln - darunter Vertreter der Hordei-, Furo-, Beny-, Peclu- und Pomoviren - als hochkonserviert (Dolja et al., 1991; Koenig et al., 1997). Diese hohe Übereinstimmung funktionell wichtiger Aminosäuren läßt auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung dieser Proteine schließen und eröffnet die Möglichkeit, die Erkenntnisse über strukturelle und funktionelle Eigenschaften des TMV-Hüllproteins partiell auch auf die Hüllproteine anderer Viren mit stäbchenförmigen Partikeln zu übertragen.

Die Grundlage für eine nachfolgende Interpretation der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Ergebnisse über essentielle Bereiche des TRV-Hüllproteins bilden daher die umfangreichen Erkenntnisse über die Partikelstruktur des TMV.

#### **7.1.1. Analyse der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse über für die Partikelbildung essentielle Bereiche des TRV-Hüllproteins**

Die Untersuchung von für die Partikelbildung relevanter Bereiche der Hüllproteine der Tobraviren TRV ON und TRV ORY orientierte sich an den zwischen allen Viren mit stäbchenförmigen Partikeln konservierten Aminosäuren. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen der Hüllproteine dieser Viren zeigt konservierte Aminosäuren an insgesamt sieben Positionen (vgl. C 4.2.1., Abb. 31). Die Relevanz von vier dieser Bereiche wurde durch sukzessive N- und C-terminale Verkürzungen und gezielte Mutationen der TRV-Hüllproteinsequenz näher untersucht.

Anhand des TRV-ON-Hüllproteins konnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Relevanz verschiedener konservierter Aminosäuren für die Partikelbildung gewonnen werden (vgl. C 4.2.1.1.). Die konservierten Aminosäuren Y<sub>5</sub>, E<sub>174</sub> und L<sub>179</sub> erwiesen sich als essentiell für die Fähigkeit des TRV ON-Hüllproteins zur Aggregation. Für das konservierte W<sub>181</sub> konnte gezeigt werden, daß diese Aminosäure an sich nicht unbedingt eine entscheidende Rolle bei der Bildung virusähnlicher Partikel spielt, sondern daß vor allem die in dieser Region herrschenden Bedingungen, wie Ladungsverhältnisse und Interaktionsmöglichkeiten, einen wesentlichen Einfluß hierauf haben. Eine Interpretation dieser Ergebnisse ist unter Einbeziehung eines auf theoretischer Ebene anhand von Sequenzvergleichen und Verwandtschaftsbeziehungen erstellten Modells der strukturellen Organisation eines TRV-Partikels (Dolja et al., 1991; Goulden et al., 1992) möglich. Dieses Modell orientiert sich stark an der weitaus besser untersuchten Partikelstruktur des TMV. Altschuh et al. (1987) konnten innerhalb des TMV-Hüllproteins zwei Domänen identifizieren, die sich durch einen hohen Anteil an zwischen sieben verschiedenen Tobamoviren konservierten Aminosäuren auszeichneten: Eine RNA-Bindungsdomäne und einen hydrophoben Kernbereich (vgl. Abb. 57 A). Ein Vergleich der TMV-Hüllproteinsequenz mit denen verschiedener anderer Viren mit stäbchenförmigen Partikeln zeigt, daß die zwischen diesen Gruppen konservierten Aminosäuren - und damit auch die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren - ausschließlich im Bereich der hydrophoben Kernregion liegen (vgl. Abb. 57 B). Es wird vermutet, daß diese Region im zum Partikel aggregierten TMV-Hüllprotein eine Art Gürtel bildet, der die vier  $\alpha$ -Helices einer Hüllprotein-Untereinheit zusammenhält und damit essentiell für die Integrität des TMV-Partikels ist (Namba et al., 1989). Werden nun einige der funktionell wichtigen Aminosäuren dieses Bereichs entfernt oder ausgetauscht, müsste sich dies signifikant auf die Fähigkeit zur Partikelbildung auswirken. Gleiches müsste auch für die Partikelbildung durch TRV ON gelten, wenn die angenommene Ähnlichkeit der Partikelstruktur zwischen Viren mit stäbchenförmigen Partikeln tatsächlich besteht.

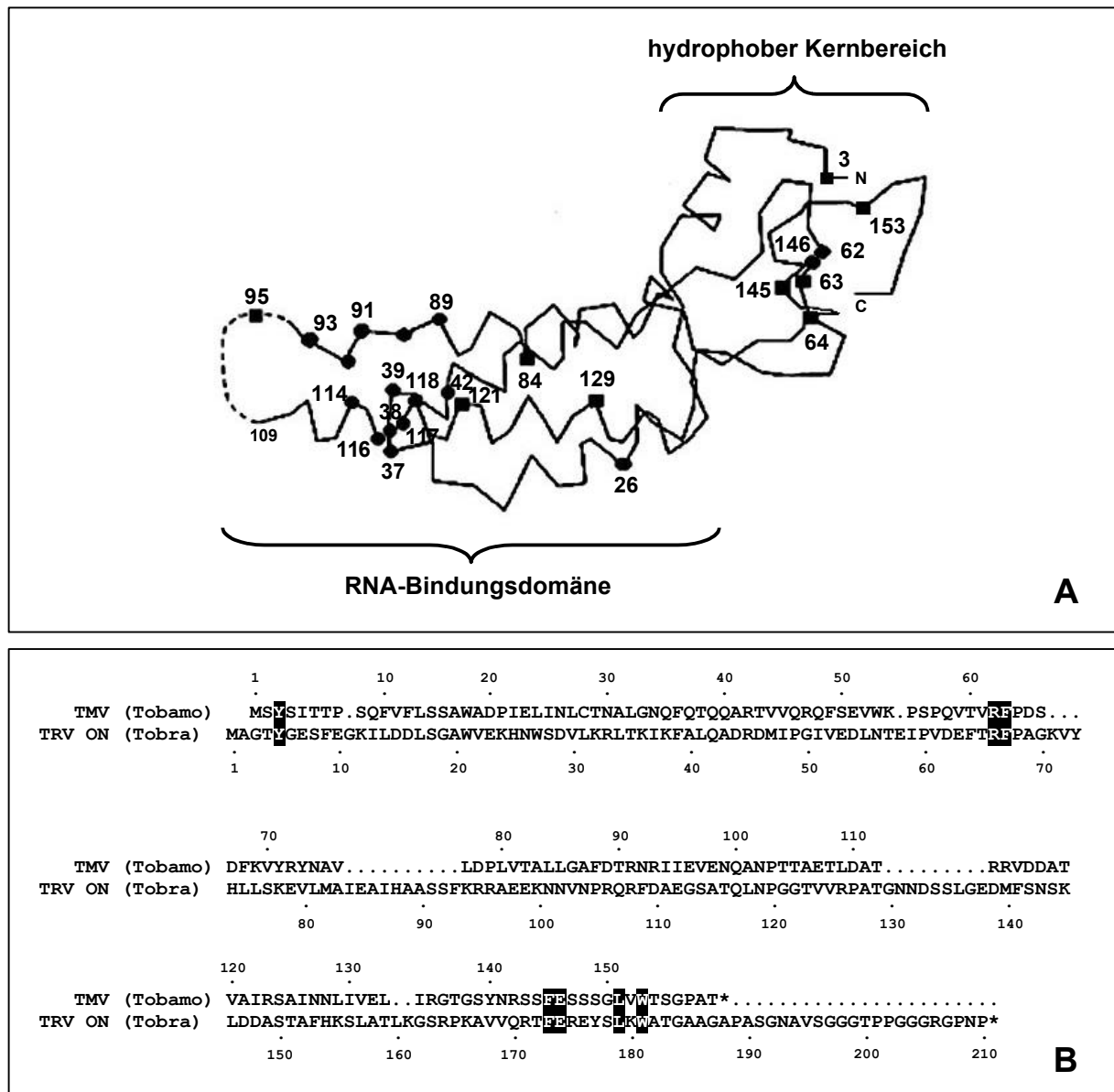


Abb. 57: Konservierte Aminosäuren innerhalb der TMV-Hüllproteinsequenz im Zusammenhang mit ihrer Position im gefalteten Protein.

**A:** Schematische Darstellung der Tertiärstruktur des TMV-Hüllproteins. Die Nummern geben die Positionen der Aminosäurereste an, die zwischen verschiedenen Tobamoviren konserviert sind. Ein gefülltes Quadrat markiert die Position hydrophober Reste, ein gefüllter Kreis markiert die Position hydrophiler Reste (modifiziert nach Altschuh et al., 1989).

**B:** Darstellung der Aminosäuresequenz des TMV-Hüllproteins im Vergleich mit der Sequenz des TRV ON-Hüllproteins. Zwischen allen Viren mit stäbchenförmigen Partikeln konservierte Aminosäuren sind schwarz unterlegt.

In der Tat lassen sich mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse die auf theoretischen Erwägungen basierenden Erkenntnisse über die Organisation der TRV-Partikelstruktur sehr gut untermauern. Dies wird durch einen Vergleich mit dem für das TMV-Hüllprotein entwickelten Modell deutlich.

Im TMV-Modell spielt das dem Y<sub>5</sub> des TRV ON-Hüllproteins entsprechende Y<sub>3</sub> eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Proteinstruktur, indem es drei voneinander entfernt liegende Bereiche der Polypeptidkette miteinander verknüpft (vgl. Abb. 57 A). Eine ähnliche Bedeutung wird dem W<sub>153</sub> zugesprochen, welches dem W<sub>181</sub> des TRV ON-Hüllproteins entspricht. Im TRV ON-Hüllprotein führte der Austausch beider Amino-

säuren zu einem Verlust der VLP-Bildungsfähigkeit, wodurch deren Wichtigkeit für die Integrität des TRV-ähnlichen Partikels bestätigt wird. Die Vermutung, daß der Zusammenhalt der drei durch diese Aminosäuren verknüpfte Regionen eventuell durch eine direkte Interaktion zwischen den beiden Aminosäuren gegeben ist, wurde teilweise dadurch widerlegt, daß ein gegenseitiger Austausch nicht möglich war (vgl. TRV-ON-Hüllprotein-Variante ON cp 1-181 Y $\leftrightarrow$ W). Allerdings muß hier in Betracht gezogen werden, daß auch eine durch diesen Austausch entstandene Umstrukturierung des Moleküls eine eventuell doch bestehende Interaktion verhindert haben könnte.

Auch E<sub>146</sub> besitzt eine essentielle Funktion innerhalb des TMV-Hüllproteins. Gemeinsam mit dem ebenfalls in allen Viren mit stäbchenförmigen Partikeln konservierten R<sub>62</sub> bildet es eine Salzbrücke, die den C-Terminus mit dem mittleren Bereich des TMV-Hüllproteins verbindet (vgl. Abb. 57 A). Ein Austausch des dem E<sub>146</sub> entsprechenden E<sub>174</sub> im TRV ON-Hüllprotein resultierte gleichfalls in einem Verlust des Aggregationsvermögens, so daß auch hier die funktionelle Bedeutung dieser Aminosäure für die Stabilität des aggregierten TRV ON-Hüllproteins offensichtlich wurde.

Dem bei Viren mit stäbchenförmigen Partikeln konservierten L<sub>179</sub> wurde im TMV-Modell bisher keine explizite Funktion zugewiesen. Es könnte aber aufgrund der räumlichen Nähe zu Y<sub>5</sub> und W<sub>181</sub> vermutet werden, daß diese Aminosäure eventuell ebenfalls an dem Zusammenhalt der drei verschiedenen Regionen der Polypeptidkette beteiligt ist.

Der Vergleich bestätigt, daß die Aminosäuren, denen im TMV-Hüllprotein wichtige Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Partikelstruktur zugeschrieben werden, auch im TRV ON-Hüllprotein eine essentielle Rolle bei der Bildung virusähnlicher Partikel spielen. Die mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Ergebnisse liefern somit eindeutige Hinweise darauf, daß die bisher nur durch vergleichende Studien angenommene Ähnlichkeit zwischen der Partikelstruktur des TMV und der der Tobraviren tatsächlich besteht.

Im Gegensatz zum TRV ON-Hüllprotein erwies sich das TRV ORY-Hüllprotein als wesentlich weniger tolerant gegenüber Verkürzungen des N- bzw. des C-Terminus. Während eine Aggregation zu VLPs im Falle des TRV ON-Hüllproteins erst dann ausblieb, wenn von den Deletionen einzelne der konservierten Aminosäuren betroffen waren (vgl. C 4.2.1.1., Abb. 32), genügte im Falle des TRV ORY-Hüllproteins bereits das Fehlen der vor dem konservierten Tyrosin gelegenen N-terminalen Aminosäuren bzw. der hinter dem konservierten Tryptophan gelegenen C-terminalen Aminosäuren, um eine Bildung von VLPs zu verhindern (vgl. C 4.2.2.1., Abb. 40).

Eine Western-Analyse der mit den verschiedenen pPVX P2A ORY cp-Konstrukten infizierten Pflanzen zeigte, daß in allen Pflanzen ausreichend Protein für eine Aggregation zur Verfügung stand. Ein Ausbleiben der VLP-Bildung aufgrund fehlenden TRV ORY-Hüllproteins konnte damit ausgeschlossen werden.

Warum im EM dennoch keine durch die verkürzten Varianten des TRV ORY-Hüllproteins gebildeten VLPs zu beobachten waren, könnte zum einen mit einer allgemein höheren Empfindlichkeit des TRV ORY-Hüllproteins gegenüber Deletionen erklärt werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß sich das aufgrund der Expression über das pPVX P2A-System anhängende P2A-Oligopeptid zusätzlich negativ auf die Aggregationsfähigkeit der verkürzten Varianten des TRV ORY-Hüllproteins auswirkte. Diese Frage hätte möglicherweise durch eine vergleichende Analyse der Sequenzen mit und ohne P2A in einem bakteriellen System geklärt werden können. Dahingehende Untersuchungen wurden allerdings nicht durchgeführt, da sich die Hüllproteinsequenz des anderen TRV-Isolats - des TRV ON - bereits als sehr viel geeigneter zur Untersuchung der VLP-Bildungsfähigkeit erwiesen hatte.

### **7.1.2. Absicherung der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse über für die Partikelbildung essentielle Bereiche des TRV ON-Hüllproteins**

Zur Untermauerung eines Ergebnisses ist es zwingend notwendig, mögliche Fehlerquellen in einem System zu erkennen und soweit als möglich auszuschließen.

Das hier verwendete, auf dem viralen Vollängenklon pPVX P2A Ascl basierende System zur Ermittlung für die Partikelbildung essentieller Bereiche des TRV ON-Hüllproteins birgt eine Reihe von Unsicherheiten, deren Klärung mehrerer zusätzlicher Untersuchungen bedurfte.

Ein allgemeines Problem bei der Expression von Nukleinsäuresequenzen mit anschließende Funktionsanalyse des exprimierten Proteins ist die Frage, ob das zu untersuchende Protein tatsächlich auch gebildet wird und wenn ja, ob es auch über einen längeren Zeitraum zur Erfüllung seiner angestrebten Funktion zur Verfügung steht. Ersteres ist bei Verwendung des pPVX P2A-System generell abgesichert. Bei Auftreten einer Infektion muß das Fremdprotein aufgrund der P2A-vermittelten Kopplung an die Expression des PVX-Hüllproteins auf jeden Fall entstehen. Ob es in der Pflanze auch über längere Zeit verbleibt, kann mit Hilfe einer Western-Analyse sichergestellt werden. Im Falle des TRV ON-Hüllproteins konnte hierdurch gezeigt werden, daß auch in den Pflanzen, in denen keine TRV ON-ähnlichen Partikel im EM detektiert werden konnten, ausreichend Protein für eine eventuelle VLP-Bildung vorhanden sein müßte (vgl. C 4.2.1.2.). Ein Ausbleiben der VLP-Bildung sollte damit auf eine Unfähigkeit der betreffenden Hüllproteine zur Aggregation zurückzuführen sein. Eine nächste Frage, die sich speziell für das pPVX P2A-System stellte, war, aus welchem Grund sich die Unfähigkeit zur Aggregation ergab. War dies tatsächlich auf die eingeführten Veränderungen in der Hüllproteinsequenz zurückzuführen oder hatte das dem C-Terminus anhängende P2A-Oligopeptid einen zusätzlichen Einfluß auf das Aggregationsvermögen? Diesem Problem konnte durch eine vergleichende Expression in einem bakteriellen System begegnet werden. Es zeigte sich, daß ausgewählte Sequenzen ohne anhängendes P2A nach Expression in *E. coli* ebenso unfähig waren, zu VLPs zu aggregieren, wie vergleichbare über pPVX P2A exprimierte Sequenzen mit P2A (vgl. C 4.2.1.3. a)). Damit schien ein Ausbleiben der VLP-Bildung tatsächlich auf die Veränderungen der Hüllproteinsequenz selbst und nicht auf die anhängende P2A-Sequenz zurückzuführen zu sein.

Eine letzte Unsicherheit ergab sich aus der Art der verwendeten Nachweismethode. Eine Bildung virusähnlicher Partikel wurde dann ausgeschlossen, wenn bei einer immunoelektronenmikroskopischen Untersuchung keine VLPs beobachtet werden konnten. Diese auf der Verwendung spezifischer Immunglobuline basierende Methode hat den Nachteil, daß eine Detektion der gesuchten Partikel nur dann erfolgt, wenn die Antikörper diese auch erkennen können. Werden z.B. durch Deletionen für die Erkennung essentielle immunogene Bereiche entfernt, so kann eine zuverlässige Detektion nicht mehr gewährleistet werden. Aufgrund einer von Legorburu et al. (1996) durchgeführten Pepscan-Analyse eines gegen das TRV-Isolat PLB gerichteten polyklonalen Antiserums könnte man vermuten, daß im Falle der stark verkürzten TRV ON-Hüllproteine gerade die Bereiche deletiert wurden, die am stärksten mit einem gegen TRV ON gerichteten Antikörper reagieren müßten. Um auch diese Fehlermöglichkeit ausschließen zu können, wurden polyklonale TRV ON-Antikörper spezifisch an eine auf einer Nylonmembran immobilisierten, stark verkürzten Variante des TRV ON-Hüllproteins gebunden, nach einer Methode von Rybicki (1986) abdissoziiert und die abdissoziierten Antikörper schließlich für eine immunoelektronenmikroskopische Detektion herkömmlicher TRV ON-Partikel verwendet. Es zeigte sich, daß mit Hilfe dieser Antikörper TRV ON-Partikel getrappt und auch dekoriert werden konnten (vgl. C 4.2.1.3. b)). Die zuvor an Epitope des stark verkürzten Hüllproteins

gebundenen Antikörper waren folglich dazu befähigt, Epitope an der Oberfläche von zu Partikeln aggregierten Hüllproteinen zu erkennen. Demnach müssten auch auf der Oberfläche der VLPs, die eventuell durch die hier untersuchten verkürzten TRV ON-Hüllproteine entstanden sind, ausreichend Epitope präsentiert worden sein, um eine Detektion zu ermöglichen. Die Methode der Immunelektronenmikroskopie zur Detektion von durch verkürzte Hüllproteine gebildeten, TRV ON-ähnlichen Partikeln konnte damit als verlässlich angesehen werden.

In Anbetracht der umfassenden Untersuchungen zur Verlässlichkeit der über pPVX P2A gewonnenen Erkenntnisse über essentielle Bereiche der TRV ON-Hüllproteins kann davon ausgegangen werden, daß die beobachteten Effekte tatsächlich auf die an der TRV ON-Hüllproteinsequenz vorgenommenen Veränderungen zurückzuführen sind und nicht auf Unzulänglichkeiten des verwendeten Systems beruhen.

## **7.2. Bildung von virusähnlichen Partikeln durch verschieden verkürzte Hüllproteine der Potyviren PVY und TEV**

Alle bisherigen Erkenntnisse über die Struktur eines potyviralen Hüllproteins und seine Organisation im Viruspartikel basieren auf biochemischen und immunologischen Untersuchungen sowie vergleichenden Analysen, die bereits vor einigen Jahren an verschiedenen Vertretern der Potygruppe vorgenommen wurden.

So verglichen Shukla and Ward (1989a) bis dahin bekannte Aminosäuresequenzen der Hüllproteine verschiedener Potyviren miteinander und konnte damit eine besondere Eigenschaft der Hüllproteine dieser Virusgruppe aufdecken. Es zeigte sich, daß der N-terminale Bereich dieser Proteine sowohl in Länge als auch in Sequenz stark zwischen den verschiedenen Potyviren variierte. Der übrige, etwa drei Viertel des Gesamtproteins umfassende Teil wies dagegen einen sehr hohen Konservierungsgrad von durchschnittlich 65% Sequenzidentität auf.

Erste Erkenntnisse über die dreidimensionale Struktur des potyviralen Hüllproteins und seiner Organisation im Viruspartikel konnten durch den gezielten Einsatz von Proteasen gewonnen werden. Durch eine vorsichtige Behandlung von Viruspartikeln verschiedener Potyviren - darunter auch TEV und PVY - mit Trypsin konnten in Abhängigkeit vom jeweiligen Virus mehr als 30 Aminosäuren vom N-Terminus und zwischen 18-20 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt werden, ohne daß die nun lediglich aus Core-Proteinen bestehenden Partikel ihre Stabilität oder gar ihre Infektiosität verloren (Allison et al., 1985; Dougherty et al., 1985; Shukla et al., 1988). Die Empfindlichkeit der N- und C-terminalen Bereiche gegenüber einer Proteasebehandlung deutet darauf hin, daß diese Regionen im gefalteten Protein an der Oberfläche des Viruspartikels liegen. Daß die Integrität der Partikel trotz fehlendem N- und C-Terminus dennoch erhalten blieb, zeigt deutlich, daß diese Bereiche anscheinend nicht essentiell für die Aufrechterhaltung der Partikelstruktur sind.

Während sich diese Studien lediglich mit dem bereits zu Partikeln assemblierten Hüllprotein beschäftigten, nutzten McDonald et al. (1976) aus virusinfizierten Pflanzen extrahiertes Protein zur direkten Untersuchung der Partikelbildung *in vitro*. Hierbei zeigte sich, daß aus infizierten *N. tabacum*-Pflanzen aufgereinigte PVY-Partikel durch Behandlung mit verschiedenen Chemikalien dissoziiert werden konnten und daß sich die dissoziierten Hüllproteine unter spezifischen physiologischen Bedingungen wieder zu virusähnlichen Partikeln zusammenschlossen. Dies erfolgte sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit der viralen RNA, wobei sich die aus den verschiedenen Ansätzen resultierenden Partikel deutlich in ihrer Morphologie voneinander unterschieden. Die in Anwesenheit von RNA gebildeten Nukleoproteine konnten in ihrer

Morphologie nicht von herkömmlichen PVY-Partikeln unterschieden werden, während die aus reinem Hüllprotein gebildeten Aggregate aus einzelnen übereinandergestapelten Scheiben zu bestehen schienen. Ausgehend von diesen Beobachtungen konnten erste Vermutungen über den Mechanismus der Assemblierung angestellt werden. So entwickelten McDonald and Bancroft (1977) einen Modellvorschlag, nach dem sich sieben bis acht Hüllprotein-Monomere zunächst zu einer Ringstruktur zusammenschließen. Erst dann bildet sich aus den einzelnen Ringen gemeinsam mit der viralen RNA ein vollständiges Partikel.

Ähnliche Untersuchungen zur Assemblierung konnten auch anhand von Hüllproteinen durchgeführt werden, die über verschiedene heterologe Systeme exprimiert wurden. So gelang Stram et al. (1993) die Expression von assemblierungsfähigem PVY-Hüllprotein in *Escherichia coli*. In Extrakten dieser Bakterien konnten virusähnliche Aggregate detektiert werden, die in Morphologie und Größe herkömmlichen PVY-Partikeln entsprachen. Auch für das *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), einem anderen Potyvirus, konnte gezeigt werden, daß über Bakterien oder Hefen exprimierte Hüllproteine zu virusähnlichen Partikeln aggregierten (Jagadish et al., 1991). Darüberhinaus konnten durch gezielte Mutationen der JGMV-Hüllproteinsequenz einzelne Aminosäuren innerhalb der Core-Region identifiziert werden, die essentiell für die Aggregationsfähigkeit dieses Proteins sind (Jagadish et al., 1991 und 1993). Dolja et al. (1994) führten in die Hüllproteingensequenz eines auf TEV basierenden Vollängerkons ebenfalls verschiedene Mutationen ein. Während der Austausch bestimmter Aminosäuren mit mutmaßlich essentieller Funktion für die Partikelbildung zu einem Verlust der Aggregationsfähigkeit führte, war eine weitere Mutante, bei der die N-terminalen Aminosäuren 5-29 entfernt wurden, immer noch in der Lage, Viruspartikel zu bilden.

Abgesehen von den in den genannten Studien gewonnenen Erkenntnissen ist nur recht wenig über für die Partikelbildung essentielle Bereiche potyviraaler Hüllproteine bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde das pPVX P2A-System daher genutzt, um weitere Informationen über die Bedeutung N- und C-terminaler Regionen für die Partikelbildung durch Hüllproteine des TEV und des PVY zu erhalten.

#### **7.2.1. Analyse der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung N- und C-terminaler Bereiche des PVY- bzw. TEV-Hüllproteins für die Partikelbildung**

Zur Untersuchung der Bedeutung der N- und C-terminalen Bereiche des PVY- bzw. des TEV-Hüllproteins für die Partikelbildung wurden verschieden verkürzte Formen dieser Proteine über pPVX P2A Ascl in *N. benthamiana*-Pflanzen exprimiert und ihre Fähigkeit zur Aggregation durch Immunelektronenmikroskopie bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind unter C 4.2.4.1. bzw. C 4.2.3.1. dargestellt.

Eine Interpretation dieser Ergebnisse gestaltet sich sehr schwierig. Der Grund hierfür liegt in den voneinander abweichenden Ergebnissen hinsichtlich der VLP-Bildungsfähigkeit von über das pPVX P2A-System exprimierten Hüllproteinvarianten im Vergleich zu den Erkenntnissen, die mit Hilfe des bakteriellen Expressionssystems gewonnen wurden. Durch Expression der Hüllproteine des TEV und des PVY über *E. coli* konnte ein signifikanter Einfluß des P2A auf die Aggregationsfähigkeit der verkürzten Proteine aufgedeckt werden (vgl. C 4.2.3.3. und C 4.2.4.3.). Wurden die Sequenzen, die sich im pPVX P2A-System als gerade noch bzw. gerade nicht mehr zur Aggregation befähigt erwiesen, im bakteriellen System mit anhängendem P2A exprimiert, konnten die gleichen



Beobachtungen gemacht werden wie bei den über pPVX P2A Ascl exprimierten Sequenzen. Wurde dagegen die reine Hüllproteinsequenz ohne jegliche Anhänge exprimiert, so zeigten sich auch die verkürzten Varianten noch in der Lage, zu VLPs zu aggregieren, die bei anhängendem P2A bereits nicht mehr zur VLP-Bildung befähigt waren. Das sämtlichen über pPVX P2A Ascl exprimierten Sequenzen anhängende P2A-Oligopeptid wirkte sich folglich entscheidend auf die Aggregationsfähigkeit der verkürzten Hüllproteinvarianten aus und führte somit zu einer Verfälschung der Ergebnisse. Wie die mit Hilfe des bakteriellen Systems erlangten Ergebnisse andeuten, werden vermutlich sehr viel stärkere Verkürzungen toleriert, als dies durch das pPVX P2A-System gezeigt werden konnte.

Folglich haben die mit Hilfe des viralen Expressionssystems gewonnenen Erkenntnisse nur beschränkte Aussagekraft.

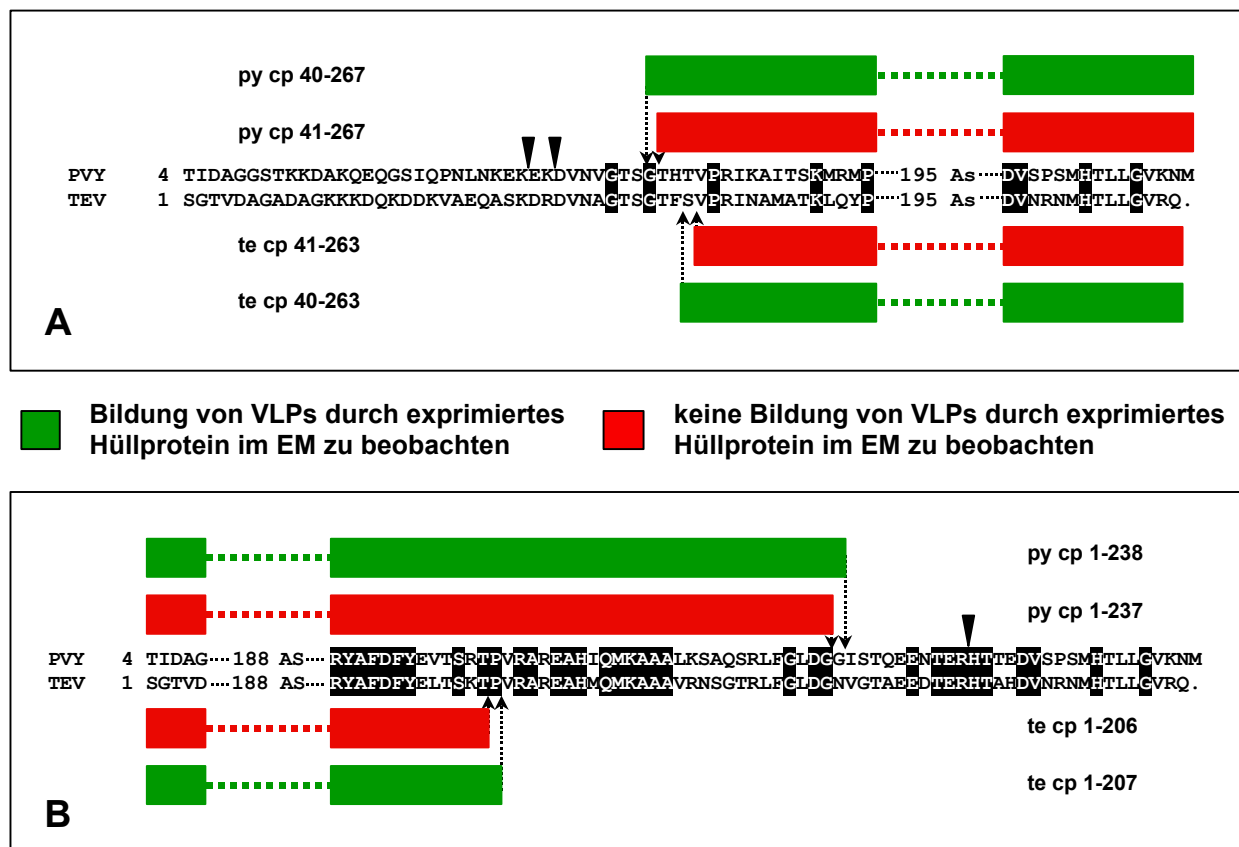


Abb. 58: Vergleichende Darstellung der VLP-Bildungsfähigkeit der über pPVX P2A Ascl exprimierten verkürzten Hüllproteine des PVY und des TEV.

**A:** Vergleich der Ergebnisse für N-terminal verkürzte Hüllproteine; **B:** Vergleich der Ergebnisse für C-terminal verkürzte Hüllproteine; ▼: markiert Stellen an N- und C-Terminus, an denen nach Trypsinbehandlung der intakten Partikel eine Spaltung erfolgt.

Ein gemeinsame Darstellung der Ergebnisse in Abb. 58 offenbart, daß die Grenze der tolerierten Deletionen am N-Terminus mit lediglich 3 Aminosäuren Unterschied bei beiden Viren innerhalb desselben Bereichs des Alignments liegt. Am C-Terminus bestehen dagegen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Toleranzgrenze. Während das P2A-haltige PVY-Hüllprotein bereits nach einer Deletion von 40 Aminosäuren nicht mehr in der Lage war, zu VLPs zu aggregieren, verlor das P2A-haltige TEV-Hüllprotein erst nach einer zusätzlichen Verkürzung von weiteren 28 Aminosäuren seine Fähigkeit zur VLP-Bildung.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit Versuchen, in denen mittels Trypsinbehandlung die Toleranz potyviral Hüllproteine gegenüber C- und N-terminalen Verkürzungen nachgewiesen werden konnte (Allison et al., 1985; Dougherty et al., 1985; Shukla et al., 1988), zeigt, daß durchaus stärkere Verkürzungen als die in diesen frühen Ansätzen zur Analyse der Partikelstruktur erreichten möglich sind (vgl. Abb. 56).

Aus welchem Grund bei einigen der N-terminal verkürzten PVY-Hüllproteine keine VLPs detektiert werden konnten, obwohl etliche andere Varianten mit sehr viel stärkeren Deletionen eine VLP-Bildung zeigten und in den infizierten Pflanzen auch ausreichend Protein zur Verfügung stand, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Vermutlich bilden sich in diesen Varianten durch die Verkürzungen bedingt Sekundärstrukturen aus, die eine korrekte Faltung der Polypeptidkette verhindern, so daß das Protein seine Aggregationsfähigkeit verliert. Desweiteren könnte das den exprimierten Hüllproteinen C-terminal anhängende P2A-Oligopeptid eine Detektion eventuell gebildeter VLPs durch die verwendeten Antikörper verhindert haben (vgl. D 7.2.2.).

### **7.2.2. Bewertung der Verlässlichkeit der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung N- und C-terminaler Bereiche des PVY- bzw. TEV-Hüllproteins für die Partikelbildung**

Anders als im Fall des TRV ON-Hüllproteins erwies sich das pPVX P2A-System für die Untersuchung der Aggregationsfähigkeit potyviral Hüllproteine als nicht sehr geeignet. Zwar bereiteten weder Expression noch Stabilität der exprimierten Proteine in den infizierten Pflanzen Probleme; mit Hilfe der Western-Analyse konnte sichergestellt werden, daß auch in den Pflanzen, in denen keine durch das jeweilige verkürzte Hüllprotein gebildeten VLPs beobachtet werden konnten, ausreichend Protein zur Verfügung stand, um eine VLP-Bildung zu gewährleisten (vgl. C 4.2.3.2. und C 4.2.4.2.). Auch die Ergebnisse hinsichtlich der Toleranzgrenze für C- und N-terminale Verkürzungen erschienen an sich für beide Viren logisch und nachvollziehbar. Eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse durch Expression ausgewählter Sequenzen in einem bakteriellen System offenbarte allerdings einen signifikanten Einfluß des den über pPVX P2A Ascl exprimierten Hüllproteinvarianten anhängenden P2A-Oligopeptids auf die Aggregationsfähigkeit dieser Proteine (vgl. C 4.2.3.3. und C 4.2.4.3.). Die Aussagekraft der mit Hilfe des pPVX P2A-Systems gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Auswirkung von N- und C-terminale Verkürzungen potyviral Hüllproteine auf die VLP-Bildungsfähigkeit wurde damit sehr eingeschränkt.

Ein weiterer Aspekt, aus dem eine Verfälschung der Ergebnisse resultieren könnte, wurde im Falle des PVY- und des TEV-Hüllproteins nicht näher untersucht - die Zuverlässigkeit der zum Nachweis der VLPs verwendeten Immunelektronenmikroskopie. Für das TRV ON-Hüllprotein konnte gezeigt werden, daß die für diese Methode verwendeten spezifischen Antikörper befähigt waren, auch die virusähnlichen Partikel zu detektieren, die sich aus stark verkürzten Hüllproteinen zusammensetzen. Ob dies auch für die hier verwendeten TEV- bzw. PVY-spezifischen Antikörper in Kombination mit den verschiedenen verkürzten Varianten der entsprechenden Hüllproteine gilt, wurde nicht überprüft. Geht man allerdings von einer für ein anderes Potyvirus durchgeführten Pepscan-Analyse aus, so müsste eine Detektion der selbst durch stark verkürzte Hüllproteine gebildeten VLPs durchaus gewährleistet sein. Das von Shukla et al. (1989b) erstellte Schema einer Pepscan-Analyse des Hüllproteins des *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) zeigt, daß neben der immunodominanten Region im variablen N-Terminus noch ausreichend weitere Epitope zur Verfügung stehen, um die Erkennung von durch verkürzte Hüllproteine gebildeten VLPs zu ermöglichen (vgl. Abb. 59).

Aufgrund der hohen Sequenzidentität der Core-Region verschiedener Potyviren müßten sich diese Erkenntnisse auch auf die Hüllproteine des TEV und des PVY übertragen lassen. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß der spezifische Nachweis sämtlicher Hüllproteine in der Western-Analyse keine Probleme bereitet hat (vgl. C 4.2.3.2. und C 4.2.4.2.). Ausgeschlossen werden kann allerdings nicht, daß das C-terminal anhängende P2A-Oligopeptid, welches aufgrund der vermuteten Organisation der TEV- bzw. PVY-Hüllproteine im VLP an der Oberfläche der virusähnlichen Partikel liegen müßte, im Falle der Hüllproteinvarianten, bei denen keine Aggregation zu beobachten war, Epitope blockierte und somit eine Erkennung dieser VLPs durch die entsprechenden Antikörper verhinderte.

Ohne weitere Prüfung muß die Verlässlichkeit der Immunelektronenmikroskopie als Methode zur Untersuchung der Bildung virusähnlicher Partikel durch über pPVX P2A exprimierte Hüllproteinvarianten des TEV- und des PVY-Hüllproteins kritisch betrachtet werden.

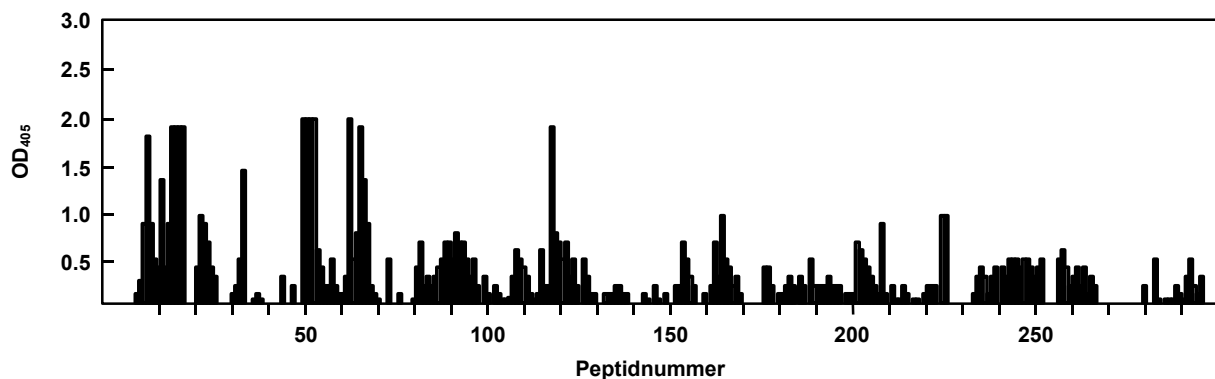


Abb. 59: Pepscan-Analyse eines gegen Partikel des Potyvirus JGMV gerichteten polyklonalen Antiserums aus Kaninchen (nach Shukla et al., 1989b)

### 7.3. Beurteilung der Zusammensetzung der durch exprimierte Hüllproteine gebildeten virusähnlichen Partikel

Mit der Untersuchung der Aggregationsfähigkeit von über heterologe Systeme exprimierten viralen Hüllproteinen ist auch immer die Frage nach der Zusammensetzung der gebildeten VLPs verbunden. Handelt es sich hierbei lediglich um leere Hüllen aus reinem Protein, oder beinhalten diese VLPs eventuell auch RNA? Und wenn ja, ist diese essentiell für den Prozeß der Aggregation? Und um welche Art von RNA handelt es sich? Fragen, deren Aufklärung sich häufig schwierig gestaltet.

Wichtige Hinweise auf die Zusammensetzung von VLPs können z.B. anhand ihrer Morphologie gewonnen werden. So unterschieden sich die aus reinem Hüllprotein bestehenden virusähnlichen Partikel von Potyviren deutlich in ihrer Länge und vor allem in ihrer Struktur von den Partikeln, die virale RNA enthielten (McDonald et al., 1976; McDonald and Bancroft, 1977). Edwards et al. (1994) und Jagadish et al. (1991) konnten anhand dieses Merkmals zeigen, daß über Insektenzellen, *E. coli* und Hefen exprimierte Hüllproteine des *Johnsongrass mosaic potyvirus* Aggregate bildeten, deren Struktur der eines aus reinem Hüllprotein bestehenden virusähnlichen Partikels glich. Daraus folgerten sie, daß die von ihnen untersuchten VLPs keine RNA enthielten, sondern aus reinem Hüllprotein zusammengesetzt waren.

Auch für Tobraviren können morphologische Aspekte als Unterscheidungskriterium genutzt werden. Semancik and Reynolds (1969) konnten nachweisen, daß virus-ähnliche Partikel aus reinem Hüllprotein sehr unterschiedlich in ihrer Länge waren und daß neben stäbchenförmigen Aggregaten zahlreiche ringförmige, aus wenigen TRV-Hüllproteinuntereinheiten bestehende Strukturen zu beobachten waren. In Anwesenheit viraler RNA bildeten sich dagegen ausschließlich stäbchenförmige Partikel mit definierten Längen.

Diese Merkmale sollten sich auch auf die hier untersuchten VLPs aus über pPVX P2A bzw. *E. coli* exprimierten Hüllproteinen anwenden lassen.

Im Falle des über pPVX P2A exprimierten ganzlängigen TRV ON-Hüllproteins wiesen die gebildeten VLPs tatsächlich sehr unterschiedliche Längen zwischen 50 und 200 nm auf. Ringförmige Strukturen konnten dagegen nicht eindeutig identifiziert werden, da die Präparate aus mit pPVX P2A infizierten Pflanzen generell einen sehr starken Hintergrund aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten sich in den Extrakten TRV ON-Hüllprotein exprimierender Bakterien neben vielen sehr kurzen TRV ON-Partikeln zahlreiche der von Semancik and Reynolds (1969) beschriebenen ringförmigen Strukturen (vgl. dazu C 4.2.1.3. c) Abb. 39). Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß es sich bei den untersuchten VLPs wahrscheinlich um leere Hüllen aus reinem TRV ON-Hüllprotein handelte.

Die Beurteilung der Struktur der untersuchten TEV- und PVY-ähnlichen Partikel erwies sich als schwieriger. Um durch die Hüllproteine dieser Viren gebildete VLPs in den pPVX P2A-infizierten Pflanzen eindeutig von den ebenfalls vorhandenen PVX-Partikeln unterscheiden zu können, war eine Dekoration mit TEV- bzw. PVY-spezifischen Antikörpern notwendig. Hierdurch wurde allerdings eine Beurteilung der Struktur unmöglich gemacht. In Präparaten in denen keine Dekoration erfolgte, konnten keine eindeutigen strukturellen Unterschiede zwischen den zu detektierenden Partikeln festgestellt werden. Nicht dekorierte TEV- und PVY-ähnliche Partikel aus bakteriellen Extrakten zeigten bei hoher Vergrößerung dagegen teilweise eine deutliche Struktur aus gestapelten Scheiben, wie sie für potyvirale Partikel aus reinem Hüllprotein typisch sind. Generell wiesen die VLPs eine sehr variable Länge auf. Anhand der morphologischen Beschaffenheiten der hier untersuchten VLPs aus TEV- bzw. PVY-Hüllprotein konnte nicht eindeutig bestimmen werden, ob diese nun RNA enthielten oder nicht. Die variable Länge und die teilweise zu beobachtende Struktur aus gestapelten Scheiben zusammen mit den Erkenntnissen über in heterologen Systemen gebildete VLPs anderer Potyviren lassen vermuten, daß die hier untersuchten virusähnlichen Partikel ebenfalls keine RNA enthielten. Vollkommen ausgeschlossen werden konnte dies allerdings nicht.

## **8. Vor- und Nachteile von viralen Vollängenklonen als Expressionssysteme**

Die Nutzung viraler Vollängenklone zur Expression von Nukleinsäuresequenzen bietet eine Vielzahl von Vorteilen. So kann die Integration einer beliebigen Fremdsequenz an geeigneter Stelle durch eine einfache Restriktions-/Ligationsreaktion in die virale cDNA erfolgen. Auch die Applikation der chimären Virussequenz z.B. durch mechanische Inokulation der Wirtspflanze ist unkompliziert. Eine Infektion durch das Virus - und damit verbunden eine Expression der Fremdsequenz - erfolgt innerhalb weniger Tage, so daß erste Resultate bereits nach kurzer Zeit vorliegen. Schließlich ist es aufgrund der hohem Replikations- und Expressionsrate der viralen Sequenz möglich, bedeutende Mengen an

rekombinantem Protein zu erzeugen, dessen Anteil am Gesamtprotein im Prozentbereich liegen kann.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten allerdings, daß die Etablierung eines effektiven Expressionssystems basierend auf viralen Vollängenklonen komplizierter ist, als es zunächst scheinen mag. Auch wenn die meisten infektiösen Klone die wesentlichen Voraussetzungen hierfür erfüllen mögen, so wird eine universelle Anwendbarkeit häufig durch konstruktsspezifische Eigenschaften deutlich eingeschränkt.

So erwiesen sich bereits im Vorfeld mehr als die Hälfte der untersuchten viralen Vollängenklonen als nicht geeignet, um als Basis für ein effektives Expressionssystem zu fungieren. Die Gründe hierfür lagen entweder in geringen Infektionsraten, in einer fehlenden Insertstabilität oder in einer Beschränkung der Infektion auf einen nur sehr kleinen Bereich in Bezug auf die Gesamtpflanze.

Ein besonderes Problem scheint die Art der Fremdgenexpression, d.h. auf welche Weise die Fremdsequenz über die virale Sequenz exprimiert werden soll, darzustellen. Eine weitverbreitete Strategie ist - wie auch im Falle des hier verwendeten pPVX 201 - die Expression über die verdoppelte Sequenz des viruseigenen subgenomischen Hüllproteinpromotors. Obwohl damit teilweise eine sehr effektive Fremdgenexpression erreicht werden kann (Baulcombe et al., 1995; Lu et al., 1998; Saitho et al., 2001; Sasaya et al., 2000), führt diese Verdopplung im Laufe der Virusinfektion häufig aufgrund homologer Rekombinationsprozesse zu einem Verlust der integrierten Fremdsequenz (Dawson et al., 1989; Chapman et al., 1992; vgl. auch D 2.2). Alternativen hierzu bieten die Verwendung der subgenomischen Hüllproteinpromotor-Sequenzen heterologer Viren (Donson et al., 1991; Kumagai et al., 1995; MacFarlane and Popovic, 2000; Shivprasad et al., 1999) oder die Expression über sogenannte IRES (*'internal ribosome entry site'*)-Sequenzen (Toth and al., 2001).

Eine weitere Strategie besteht - wie im Fall des pPVX P2A - in der Nutzung des viruseigenen subgenomischen Hüllproteinpromotors zur gemeinsamen Expression der Fremdsequenz und des für die Etablierung einer normalen Virusinfektion häufig essentiellen Hüllproteins. Um dennoch die Expression zweier voneinander unabhängiger Proteine zu erlauben, sind die für diese Proteine kodierenden Gene über spezifische Sequenzen, wie z.B. der kodierenden Sequenz für das P2A-Oligopeptid aus FMDV, verbunden, welche während des Translationsprozesses die Expression von Einzelproteinen vermitteln. Insertinstabilitäten wie im Fall des verdoppelten Hüllproteinpromotors sind hier nicht zu beobachten. Aufgrund der Kopplung an die Expression des für den Zell-zu-Zell-Transport und damit für die Entwicklung einer systemischen Infektion notwendigen Hüllproteins kann immer davon ausgegangen werden, daß im Falle einer Infektion auch das Fremdprotein in der infizierten Zelle zumindest vorübergehend vorhanden ist. Zudem garantiert diese Strategie eine Expression des Fremdproteins in sehr hohen Mengen, da es zu gleichen Anteilen wie das virale Hüllprotein produziert wird. Obwohl dieses System eine Reihe von Vorteilen aufweist, birgt die hier angewandte Expressionsstrategie auch einige Nachteile hinsichtlich der Nutzung solcher Konstrukte zur Fremdgenexpression. Diese Nachteile ergeben sich daraus, daß die Aminosäuren des P2A-Oligopeptids nach Abschluß des Translationsprozesses an der Fremdproteinsequenz verbleiben. Dies kann - wie es für die Hüllproteinsequenzen des TEV und des PVY gezeigt werden konnte (vgl. D 7.2.2.) - zu einer deutlichen Beeinflussung der Funktion der auf diese Weise exprimierten Fremdproteine führen. Mit Hilfe dieses Systems ermittelte Ergebnisse sind daher immer unter Einbeziehung dieses Aspekts zu bewerten.

Eine besondere Variante zur Expression von Fremdsequenzen bieten Vollängenklone, die auf den Genomen von Potyviren basieren. Die Besonderheit besteht in der

Expression der potyviralen RNA in Form eines Polyproteins, das erst im Anschluß an den Translationsprozeß durch viruskodierte Proteasen in die entsprechenden Einzelproteine prozessiert wird. Dieser spezielle Mechanismus eröffnet die Möglichkeit, Fremdgensequenzen an geeigneter Stelle in die virale Sequenz einzubauen, die dann über zusätzlich eingeführte Proteaseerkennungssequenzen im Zuge der Polyproteinprozessierung ebenfalls freigesetzt werden. Beispiele hierfür sind neben den hier verwendeten Vollängenklonen des TEV und des CIYVV, infektiöse Klone des *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), des *Plum pox virus* (PPV) und des *Lettuce mosaic virus* (LMV) (Choi et al., 2000; Fernández-Fernández et al., 2001; German-Retana et al., 2000; Guo et al., 1998; Masuta et al., 2000). Auch diese Strategie hat den Vorteil, daß immer davon ausgegangen werden kann, daß im Falle einer Infektion auch tatsächlich das gewünschte Fremdprotein zumindest zeitweise vorliegt und daß es in gleichen Mengen wie die übrigen viralen Proteinen gebildet wird. Der entscheidende Nachteil ist allerdings auch hier, daß aufgrund des Prozessierungsprozesses N- und C-terminal zusätzliche Aminosäuren - zurückzuführen auf die Proteaseerkennungssequenzen - verbleiben. Wie das in dieser Arbeit untersuchte Beispiel des TRV ON-Hüllproteins zeigt (vgl. D 6.), können sich vermutlich auch diese Sequenzen auf die Funktionsfähigkeit der exprimierten Proteine auswirken.

Ein Problem, das sich sowohl für das pPVX P2A- als auch für das pTEV H/C-System speziell für die hier angestrebte Nutzung zur Evaluierung des antiviralen Potentials von Nukleinsäuresequenzen stellte, ist, daß sich mit diesen Systemen möglicherweise nur Sequenzen ermitteln lassen, die Protein-vermittelte Resistenzen erzeugen. In beiden Fällen erfolgt die Transkription der Fremdsequenz in Kombination mit zusätzlichen Sequenzen; entweder in Assoziation mit den kodierenden Sequenzen für P2A und Hüllprotein im pPVX P2A-System oder als Teil einer Poly-mRNA im Falle des pTEV H/C. Dieser hohe Anteil an unspezifischer RNA könnte den Prozeß der RNA-vermittelten Resistenz unmöglich machen. Dies würde zum Teil auch das in dieser Arbeit beobachtete Ausbleiben von Resistenzen bei Expression verschiedener Sequenzen mit nachgewiesener Resistenzwirkung auf RNA-Ebene erklären (vgl. D 4.1. und D 5.).

Eine generelle Schwierigkeit bei der Verwendung viraler Vollängenklone zur Bestimmung der Resistenzwirkung von Nukleinsäuresequenzen in einem homologen System ergibt sich aus dem durch die Expression der viralen Sequenz festgelegten Zeitraum, in dem die zu testende Sequenz zur Verfügung steht. Ein wesentlicher Aspekt der pathogen-vermittelten Resistenz liegt in der Störung der im Zuge einer Infektion ablaufenden Prozesse. Das Vorhandensein viraler Sequenz am falschen Ort und/oder zum falschen Zeitpunkt während des Infektionszyklus scheint eklatante Auswirkung auf die Entwicklung einer normalen Virusinfektion haben zu können (Baulcombe, 1996). In einem homologen System, in dem die antivirale Wirkung einer Nukleinsäuresequenz gegenüber dem exprimierenden Virus selbst untersucht werden soll, werden die zu testenden Sequenzen gleichzeitig mit den für eine normale Virusinfektion notwendigen Komponenten gebildet. Für eine Störung des Infektionsverlauf durch diese Sequenzen könnte es damit in manchen Fällen schon zu spät sein. Das antivirale Potential würde in diesem Fall nicht wirksam werden und könnte somit auch nicht ermittelt werden. Besser geeignet wäre hier ein heterologes System, in dem das antivirale Potential der Fremdsequenz nicht gegenüber dem exprimierenden Virus selbst, sondern im Rahmen einer Doppelinfektion gegenüber einem anderen Virus untersucht wird. Hier würde das Virus, gegen das sich die antivirale Wirkung richten soll, erst eingesetzt werden, wenn in der durch den Vollängenklon vorinfizierten Pflanze die zu testende Fremdsequenz bereits exprimiert worden ist. Somit könnten auch hemmende Effekte zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion erfasst werden. Der für ein solches System verwendete

Vollängenklon sollte allerdings einige wichtige Voraussetzung erfüllen: (1) Er sollte bei Infektion nur sehr milde Symptome hervorrufen, um eine zu starke Schädigung der infizierten Pflanze vor Inokulation mit dem zweiten Virus auszuschließen; (2) Er sollte dennoch eine gleichmäßige Verteilung in der infizierten Pflanze aufweisen, um eine Expression der zu testenden Sequenz im möglichst weiten Bereichen zu gewährleisten und (3) Zwischen dem exprimierenden Virus und dem ‚Test‘-Virus dürfen keine natürlichen Unverträglichkeiten bestehen, die bereits von vorneherein zu einer Hemmung der Infektion durch das eine oder das andere Virus führen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Verwendung viraler Vollängenklone zur Fremdgenexpression sowie als Grundlage für ein Testsystem zur Evaluierung des antiviralen Potentials von Nukleinsäuresequenzen auf jeden Fall eine Vielzahl von Möglichkeiten bietet und eine vielversprechende Alternative bzw. Ergänzung zum transgenen System darstellt. Allerdings sollte für jede Anwendung spezifisch abgewägt werden, welches Expressionssystem zur Erreichung des gewünschten Ergebnisses am besten geeignet ist. Zusätzlich sollten bei der Interpretation der Ergebnisse mögliche beeinflussende Faktoren, die sich aus dem System selbst ergeben, mit einbezogen werden. Letztlich bleibt zu hoffen, daß weitere Forschung die Optimierung vorhandener und die Entwicklung neuer Konstrukten vorantreibt, so daß in Zukunft zuverlässige Systeme zur Expression von Fremdsequenzen auf nicht-transgener Ebene zur Verfügung stehen.

## E. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten auf der Basis von infektiösen Vollängenklonen pflanzenviraler Genome die Grundlagen für ein Testsystem entwickelt werden, mit dessen Hilfe sich das antivirale Potential von Nukleinsäuresequenzen schon vor der wesentlich aufwendigeren Herstellung von transgenen Pflanzen bestimmen läßt. Die zu testenden Nukleinsäuresequenzen können an geeigneten Stellen in die viralen cDNA-Klone eingebaut und im Zuge der durch die chimären Vollängenklone in einer entsprechenden Wirtspflanze hervorgerufenen Infektion gemeinsam mit der viralen Sequenz repliziert und exprimiert werden.

Die Vorteile viraler Vollängenklone als Expressionssysteme liegen (1) in der leichten Handhabbarkeit sowohl hinsichtlich gentechnischer Manipulation als auch im Hinblick auf die Applikation auf die gewünschte Wirtspflanze, (2) in einer schnellen Ausbreitung der Infektion, wodurch die Gewinnung von Ergebnissen innerhalb von kurzer Zeit gewährleistet ist, und (3) in einer hohen Replikations- und Expressionsrate, die sich nicht nur auf die virale Sequenz, sondern auch auf die integrierte Fremdsequenz bezieht und somit eine Expression der Fremdsequenz zu hohen Anteilen in der infizierten Pflanze erlaubt. Diese Eigenschaften machen virale Vollängenklone zu idealen Kandidaten für das in dieser Arbeit angestrebte Testsystem.

Zur Gewinnung eines für die geplanten Untersuchungen geeigneten Vollängenklons wurden infektiöse cDNA-Klone der Viren CIYVV, CymMV, PVX und TEV zunächst durch die Einführung spezifischer Modifikationen - wie der Einführung einer zusätzlichen *Ascl*-Schnittstelle - optimiert und anschließend auf ihre Eignung zur Expression von Fremdsequenzen getestet. Entscheidende Kriterien waren hierbei die Zuverlässigkeit der Infektion, die Stabilität der integrierten Fremdsequenz und die Höhe der Expression.

Die auf dem CIYVV bzw. dem CymMV basierenden Vollängenklone und der cDNA-Klon pPVX 201 *Ascl* erwiesen sich als ungeeignet, da entweder keine gleichmäßige Verteilung des Virus in der infizierten Pflanze vorlag (pCIYVV*Ascl*/Nla), die Infektiosität zu gering war (pCymMV P2A) oder die Insertstabilität nicht gegeben war (pPVX 201 *Ascl*). Die Vollängenklone pTEV H/C *Ascl* und pPVX P2A *Ascl* erfüllten dagegen die an sie gestellten Anforderungen hinreichend, so daß mit diesen Konstrukten weitergearbeitet wurde.

Generell sollte es möglich sein, den Einfluß einer zu testenden Sequenz entweder auf das exprimierende Virus selbst (homologes System) oder durch Anwendung von Doppelinfektionen auf ein anderes Virus (heterologes System) zu untersuchen. Mit Hilfe des pTEV H/C *Ascl* und des pPVX P2A *Ascl* gelang es allerdings nicht ein heterologes Testsystem zu etablieren, da eine durch diese Konstrukte hervorgerufene Infektion zu starken Schädigungen der Wirtspflanzen führte, wodurch die Vermehrung von anderen Viren (z.B. PVY und TRV) von vorneherein so stark beeinflusst wurde, daß eine zuverlässige Infektion nicht gewährleistet war. Daher wurde lediglich der Einfluß verschiedener Fremdsequenzen auf Replikation und Ausbreitung der exprimierenden Viren selbst untersucht.

Mit Hilfe des pPVX P2A-Systems wurden unterschiedliche Bereiche des PVX-Genoms exprimiert und der Einfluß dieser Sequenzen auf die Virusvermehrung und -ausbreitung bestimmt. Bei Expression verschiedener Teilbereiche des Replikations-assoziierten Proteins P166 zeigten die meisten Teilsequenzen keinen sichtbaren Einfluß auf die entstehende PVX-Infektion. In einigen Fällen konnte allerdings eine deutliche



Abschwächung der Symptomausprägung bei normaler Virusakkumulation beobachtet werden. Zwei der exprimierten Teilstücke bewirkten dagegen eine Symptomverstärkung.

Die in einem *Triple gene block* organisierten Transportproteine P25, P12 und P8 des PVX wurden ebenfalls auf ihr antivirales Potential hin untersucht. Für das ganzlängige P25 und verschiedene Teilbereiche konnte keine Hemmung der Virusinfektion nachgewiesen werden. Vielmehr führte die Expression des ganzlängigen P25 und zweier N-terminal verkürzter Teilstücke zu einer extremen Symptomverstärkung. Die Expression von Teilstücken, die eine Deletion im C-terminalen Bereich aufwiesen, hatte dagegen keinen Einfluß auf die Symptombildung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß das P25 neben seiner Beteiligung am Zell-zu-Zell-Transport auch eine Rolle bei der Symptombildung spielt, wobei die hierfür relevanten Bereiche in der die Helikasemotive V und VI umfassenden C-terminalen Domäne zu liegen scheinen. Unterstützt wird diese Vermutung durch verschiedene Veröffentlichungen, in denen ebenfalls eine Verbindung zwischen dem P25 und dem durch PVX verursachten Symptombild gezeigt werden konnte (Ares et al., 1998; Malcuit et al., 1999).

Im Gegensatz zu der symptomverstärkenden Wirkung des P25 und seiner Derivate konnte für das zweite TGB-Protein (P12) bei Expression der ganzlängigen Sequenz eine deutliche Hemmung der Virusinfektion beobachtet werden. Der Hemmeffekt, der bei Expression verkürzter Varianten nicht auftrat, äußerte sich in einer stark verzögert eintretenden Infektion mit mildem Verlauf, sehr geringer Virusakkumulation und späterer Erholung der Pflanze. Dieser Phänotyp macht die ganzlängigen P12-Sequenz, die - wie alle über pPVX P2A exprimierten Fremdsequenzen - 19 zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus trägt, zu einem attraktiven Kandidat für die Expression in transgenen Pflanzen.

Durch die Expression bestimmter Teilstücke des dritten TGB-Proteins (P8) konnte eine starke Einschränkung der Virusausbreitung erreicht werden. Die PVX-Infektion blieb auf wenige punktförmige Nekrosen auf inokulierten und teilweise auch auf systemische infizierten Blättern beschränkt. Ein ähnlicher Effekt ließ sich auch durch Expression der ganzlängigen Sequenz des dritten TGB-Proteins (P10) aus dem Potexvirus CymMV erreichen. Die Fähigkeit, eine Einschränkung der Virusausbreitung zu bewirken, scheint somit generell in diesen Sequenzen vorhanden zu sein.

Es konnte ausgeschlossen werden, daß der durch bestimmte P8-Teilstücke vermittelte Hemmeffekt auf einen Funktionsverlust hinsichtlich der Translokationsfunktion des P8 und daraus resultierend auf eine Störung der für den normalen Ablauf des intrazellulären Transports notwendigen Interaktion zwischen P12 und P8 zurückzuführen ist. Möglich ist dennoch eine Beeinflussung anderer Bereiche des intrazellulären Transports oder auch eine Wirkung auf der Ebene des interzellulären Transports. Eine durch die Expression der P8-Teilstücke bei gleichzeitiger Anwesenheit von PVX hervorgerufene Hypersensitivitätsreaktion als Ursache für die beobachteten Phänomene wäre ebenfalls denkbar. Die den Hemmeffekt auslösenden P8-Teilstücke sind weitere interessante Kandidaten für die Expression in transgenen Pflanzen.

Desweiteren wurden die Hüllproteingene verschiedener Viren (CIYVV, CymMV, PVX, PVY, TEV, TRV ON und TRV ORY) sowohl über pPVX P2A Ascl als auch über pTEV H/C Ascl exprimiert. Obwohl in transgenen Pflanzen zumindest bei Verwendung der homologen Hüllproteine eine Resistenzinduktion bereits beschrieben worden ist, zeigte keines der verwendeten Hüllproteine eine hemmende Wirkung gegenüber den exprimierenden Viren PVX und TEV. Die Erklärung für diese Diskrepanz liegt wahrscheinlich darin, daß die Resistenzwirkung der entsprechenden Hüllproteinsequenzen bei Expression über die beiden Vollängerkclone aus verschiedenen, systembedingten Gründen nicht zur Geltung kommen konnte.

Für das pPVX P2A-System konnte im Zusammenhang mit der Expression einiger der Hüllproteinsequenzen allerdings eine andere, sehr interessante Beobachtung gemacht werden. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der durch diese Konstrukte infizierten Pflanzen offenbarte neben den erwarteten PVX-Partikeln zusätzlich virusähnliche Partikel, die durch die über den Vollängenklon exprimierten Hüllproteine des PVY, des TEV, des TRV ON oder des TRV ORY gebildet worden sind. Dies eröffnete die Möglichkeit, die Aggregationsfähigkeit der Hüllproteine dieser Viren in einem pflanzlichen System zu studieren und damit wichtige Erkenntnisse über für die Partikelbildung essentielle Bereiche zu gewinnen.

Durch Expression verschieden verkürzter und veränderter Hüllproteinsequenzen des TRV-Isolats ON über das pPVX P2A-System wurden für die Partikelbildung essentielle Aminosäuren am N- und am C-Terminus des TRV ON-Hüllproteins identifiziert. Es zeigte sich, daß sich diese Ergebnisse weitgehend mit den durch theoretische Ansätze ermittelten Erkenntnissen deckten. Aminosäuren, für die anhand von Sequenzvergleichen eine essentielle Funktion für die Partikelbildung zu vermuten war, erwiesen sich auch in den über den Vollängenklon exprimierten TRV ON-Hüllproteinsequenzen als unbedingt notwendig. Das P2A-Oligopeptid, das allen über pPVX P2A exprimierten Fremdsequenzen C-terminal anhängt, schien die Bildung von virusähnlichen Partikeln nicht zu beeinflussen, wie ein Vergleich mit den in einem bakteriellen System erzielten Ergebnisse zeigte.

Für die Hüllproteinsequenzen der Potyviren PVY und TEV konnten mit Hilfe des pPVX P2A-Systems Regionen am N- und am C-Terminus bestimmt werden, deren Deletion ohne Einfluß auf die Bildung virusähnlicher Partikel blieb. Es wurden stärkere Deletionen toleriert, als nach Versuchen mit trypsinbehandelten Partikeln anzunehmen war (Shukla et al., 1988). Es stellte sich allerdings heraus, daß das den exprimierten Sequenzen C-terminal anhängende P2A-Oligopeptid einen hemmenden Einfluß auf die Aggregationsfähigkeit der potyviralen Hüllproteine ausübte, da bei Expression von Sequenzen ohne P2A im bakteriellen System auch im Fall von Hüllproteinvarianten eine Bildung virusähnlicher Partikel beobachtet werden konnten, die mit P2A nicht mehr zur Aggregation befähigt waren.

Die in dieser Arbeit zusammengestellten Ergebnisse zeigen einige der vielen Möglichkeiten - aber auch einige Schwierigkeiten - auf, die sich bei der Verwendung von viralen Vollängenklonen zur Expression von Fremdproteinen in Pflanzen ergeben. In weiterführenden Untersuchungen soll geprüft werden, ob mit Hilfe der Sequenzen, die im viralen System eine virushemmende Wirkung zeigten, auch in transgenen Pflanzen ein Hemmeffekt erzeugen werden kann. Mit Hilfe des viralen Expressionssystems sollte dann mit geringem Aufwand eine Optimierung dieser Sequenzen hinsichtlich ihrer Effektivität und biologischen Sicherheit möglich sein. Anhand der Untersuchungen zur Partikelbildungsfähigkeit von Hüllproteinen verschiedener Viren konnte gezeigt werden, daß sich ein auf viralen Vollängenklonen basierendes System auch für eine Funktionsanalyse von Proteinen eignet. Die zur Expression von Fremdsequenzen verwendeten Vollängenklone weisen allerdings einige Nachteile auf, wie z.B. das Vorhandensein von zusätzlichen Sequenzen am N- bzw. am C-Terminus des exprimierten Fremdproteins oder die starke Symptombildung. Die Entwicklung von Vollängenklonen, die diese Nachteile nicht aufweisen, wäre damit ebenfalls Ziel weiterführender Arbeiten.

## F. Literatur

- Ahlquist, P. and Janda, M.** (1984a). cDNA cloning and in vitro transcription of the complete genome of brome mosaic virus genome. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2876-2882
- Ahlquist, P., French, R., Janda, M. and Loesch-Fries, S.** (1984b). Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7066-7070
- Allison, R.F., Dougherty, W.G., Parks, T.D., Willis, L., Johnston, R.E., Kelly, M.E. and Armstrong, F.B.** (1985). Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* **147**: 309-316
- Altschuh, D., Lesk, A.M., Bloomer, A.C. and Klug A.** (1987). Correlation of co-ordinated amino acid substitutions with function in viruses related to tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **193**: 693-707
- Anderson, J.M., Palukaitis, P. and Zaitlin, M.** (1992). A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8759-8763
- Angell, S.M., Davies, C. and Baulcombe, D.C.** (1996). Cell-to-cell movement of potato virus X is associated with a change in size-exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana glauca*. *Virology* **216**: 197-201
- Angell, S.M. and Baulcombe, D.C.** (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO Journal* **16**: 3675-3684
- Angell, S.M. and Baulcombe, D.C.** (1999). Potato virus X amplicon-mediated silencing of nuclear genes. *Plant Journal* **20**: 357-362
- Angenent, G.C., Posthumus, E. and Bol, J.F.** (1989). Biological activity of transcripts synthesized in vitro from full-length and mutated DNA copies of tobacco rattle virus RNA2. *Virology* **173**: 68-76
- Angenent, G.C., van Den Ouweland, J.M.W. and Bol, J.F.** (1990). Susceptibility to virus infection of transgenic tobacco plants expressing structural and nonstructural genes of tobacco rattle virus. *Virology* **175**: 191-198
- Ares, X., Calamante, G., Cabral, S., Lodge, J., Hemenway, P., Beachy, R.N. and Mentaberry, A.** (1998). Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamovirus. *J. Virol.* **72**: 731-738
- Atabekov, J.G. and Taliansky, M.E.** (1990). Expression of plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv. Virus Res.* **38**: 201-248
- Audy, P., Palukaitis, P., Slack, S.A. and Zaitlin, M.** (1994). Replicase-mediated resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 15-22
- Barrett, A.J.** (1987). The cystatins: A new class of peptidase inhibitors. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 193-196
- Baulcombe, D.C., Gilbert, J.E., Goulden, M., Köhm, B.A. and Santa Cruz, S.** (1994). Molecular biology of resistance to potato virus X in potato. *Biochem. Soc. Symp.* **60**: 207-218
- Baulcombe, D.C., Chapman, S. and Santa Cruz, S.** (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant Journal* **7**: 1045-1053
- Baulcombe, D.C.** (1996a). RNA as a target and an inhibitor of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **32**: 79-88
- Baulcombe, D.C.** (1996b). Mechanism of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**: 1833-1844
- Beachy, R.N., Loesch-Fries, S. and Tumer, N.E.** (1990). Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**: 451-474
- Beachy, R.N.** (1997a). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 215-220
- Beachy, R.N.** (1997b). Movement protein-mediated resistance. *Summary of Public Meeting on Virus Resistant Transgenic Plants* Seite 21-23
- Beachy, R.N.** (1999). Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: Discovery mechanisms and exploitation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**: 659-664

- Beck, D.L., Guilford, P.J., Voot, D.M., Andersen, M.T. and Forster, R.L.S.** (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology* **183**: 695-702
- Beck, D.L., Van Dolleweerd, C.J., Lough, T.J., Balmori, E., Voot, D.M., Andersen, M.T., O'Brien, I.E.W. and Forster, R.L.S.** (1994). Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10310-10314
- Bendahmane, M., Fitchen, J.H., Zhang, G. and Beachy, R.N.** (1997). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: Correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J. Virol.* **71**: 7942-7950
- Bertioli, D.J., Harris, R.D., Edwards, M.L., Cooper, J.I. and Hawes, W.S.** (1991). Transgenic plants and insect cells expressing the coat protein of arabis mosaic virus produce empty virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **72**: 1801-1809
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *DNA* **4** : 165-170
- Bjerrum, O.J. and Schafer-Nielsen, C.** (1986). Analytical electrophoresis. Verlag Chemie, Weinheim (ed. M.J. Dunn)
- Blanc, S., Dolja, V.V., Llave, C. and Pirone, T.P.** (1999). Histidine-tagging and purification of tobacco etch potyvirus helper component protein. *J. Virol. Meth.* **77**: 11-15
- Bleykasten-Grosshans, C., Guilley, H., Bouzoubaa, S., Richards, K.E. and Jonard, G.** (1997). Independent expression of the first two triple gene block proteins of beet necrotic yellow vein virus complements virus defective in the corresponding gene but expression of the third protein inhibits viral cell-to-cell movement. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 240-246
- Bloomer, A.C., Champness, J.N., Bricogne, G., Staden, R. and Klug, A.** (1978). Protein disc of tobacco mosaic virus at 2.8Å resolution showing the interactions within and between subunits. *Nature* **276**: 362-368
- Bol, J.F., Kraal, B. and Brederode, F.T.** (1974). Limited proteolysis of alfalfa mosaic virus: Influence on structural and biological function of the coat protein. *Virology* **58**: 101-110
- Bragard, C., Duncan, G.H., Wesley, S.V., Naidu, R.A. and Mayo, M.A.** (2000). Virus-like particles assemble in plants and bacteria expressing the coat protein gene of indian peanut clump virus. *J. Gen. Virol.* **81**: 267-272
- Braun, C.J. and Hemenway, C.L.** (1992). Expression of aminoterminal portions or full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. *Plant Cell* **4**: 735-744
- Brederode, F.T., Taschner, P.E.M., Posthumus, E. and Bol, J.F.** (1995). Replicase-mediated resistance to alfalfa mosaic virus. *Virology* **207**: 467-474
- Brisson, N., Paszkowski, J., Penswick, J.R., Gronenboom, B., Potrykus, I. and Hohn, T.** (1984). Expression of a bacterial gene in plants. *Nature* **310**: 511-514
- Carr, J.P. and Zaitlin, M.** (1991). Resistance in transgenic tobacco plants expressing a nonstructural gene sequence of tobacco mosaic virus is a consequence of markedly reduced virus replication. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 579-585
- Carr, J.P., Gal-On, A., Palukaitis, P. and Zaitlin, M.** (1994). Replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants involves suppression of both virus replication in inoculated leaves and long-distance movement. *Virology* **199**: 439-447
- Carrington, J.C., Kasschau, K.D., Mahajan, S.K. and Schaad, M.C.** (1996). Cell-to-cell movement and long-distance transport to viruses in plants. *Plant Cell* **8**: 1669-1681
- Chaplin, P.J., Camon, E.B., Villarreal-Ramos, B., Flint, M., Ryan, M.D. and Collins, R.A.** (1999). Production of interleukin-12 as a self-processing polypeptide. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **19**: 235-241
- Chapman, S., Kavanagh, T. and Baulcombe, D.** (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant Journal* **2**: 549-557
- Chen, Z.C., White, R.F., Antomiw, J.F. and Lin, Q.** (1991). Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on the infection of plant viruses. *Plant Pathol.* **40**: 612-620

- Chia, T.F., Chan, Y.S. and Chua, N.H.** (1992). Characterization of cymbidium mosaic virus coat protein gene and its expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **18**: 1091-1099
- Choi, I.R., Stebger, D.C., Morris, T.J. and French, R.** (2000). A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals. *Plant Journal* **23**: 547-555
- Clark, M.F. and Adams, A.N.** (1977). Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**: 475-483
- Clark, W.G., Fitchen, J.H., Nejdat, A., Deom, C.M. and Beachy, R.N.** (1995a). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus (TMV). II. Challenge by a mutant with altered virion surface does not overcome resistance conferred by TMV coat protein. *J. Gen. Virol.* **76**: 2613-2617
- Clark, W.G., Fitchen and Beachy, R.N.** (1995b). Studies of coat protein-mediated resistance to TMV. *Virology* **208**: 485-491
- Cockerham, G.** (1970). Genetical studies on resistance on potato virus X and Y. *Heredity* **25**: 309-348
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J.A., Dodds, J.A. and Beachy, R.N.** (1995). A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* **206**: 307-313
- Cuozzo, M., O'Connell, K.M., Kaniewski, W., Fang, R.X., Chua, N.H. and Tumer, N.E.** (1988). Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* **6**: 549-557
- Dalsgaard, K., Uttenthal, A., Jones, T., Xu, F., Merryweather, A., Hamilton, W.D.O., Langeveld, J.P.M., Boshuizen, R.S., Kamstrup, S., Lomonossoff, G.P., Porta, C., Vela, C., Casal, J.I., Meloen, R.H. and Rodgers, P.B.** (1997). Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnology* **15**: 248-252
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A. and Richberg, M.H.** (1996). Death don't have no mercy - cell-death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807
- Davies, C., Hills, G. and Baulcombe, D.C.** (1993). Sub-cellular localization of the 25-kDa protein encoded in the triple gene block of potato virus X. *Virology* **197**: 166-175
- Dawson, W.O., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E., Bubrick, P., Raffo, A.J., Shaw, J.J., Grantham, G.L. and Desjardins, P.R.** (1989). A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology* **172**: 285-292
- De Felipe, P., Martín, V., Cortés, M.L., Ryan, M.D. and Izquierdo, M.** (1999). Use of the 2A sequence from foot-and-mouth disease virus in the generation of retroviral vectors for gene therapy. *Gene therapy* **6**: 198-208
- De Haan, P.** (1998). Mechanisms of RNA-mediated resistance to plant viruses. *Meth. Mol. Biol.* **81**: 533-546
- Deom, C.M., Schubert, K.R., Wolf, S., Holt, C.A., Lucas, W.J., and Beachy, R.N.** (1990). Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87** : 3284-3288
- Deom, C.M., Wolf, S., Holt, C.A., Lucas, W.J., Beachy, R.N.** (1991). Altered function of the tobacco mosaic virus movement protein in a hypersensitive host. *Virology* **180** : 251-256
- Deom, C.M., Lapidot, M. and Beachy, R.N.** (1992). Plant virus movement proteins. *Cell* **69**: 221-224
- Depico, B., Lowe, A.L., Wilson, I.D., Merodio, C. and Grierson, D.** (1993). Cloning and characterization of avocado fruit mRNAs and their expression during ripening and low-temperature storage. *Plant Mol. Biol.* **21**: 437-449
- De Zoeten, G.A., Penswick, J.R., Horisberger, M.A., Ahl, P., Schultze, M. and Hohn, T.** (1989). The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virology* **172**: 213-222
- Dinesh-Kumar, S.P., Whitham, S., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B.** (1995). Transposon tagging to tobacco mosaic virus resistance gene N: Its possible role in the TMV-N-mediated signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4175-4180
- Dodds, J.A., Lee, S.Q. and Tiffany, M.** (1985). Cross protection between strains of cucumber mosaic virus: Effect of host and type of inoculum on accumulation of virions and double-stranded RNA of challenge strain. *Virology* **144**: 301-309

- Dolja, V.V., Boyko, V.P., Agranovsky, A.A. and Koonin, E.V.** (1991). Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: Two families with distinct patterns of sequence and probably conservation. *Virology* **184**: 79-86
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G. and Carrington, J.C.** (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal* **13**: 1482-1491
- Dolja, V.V., Peremyslov, V.V., Keller, K.E., Martin, R.R. and Hong, J.** (1998). Isolation and stability of histidine-tagged proteins produced in plants via potyvirus gene vectors. *Virology* **252**: 269-274
- Donnelly, M.L.L., Gani, D., Flint, M., Monaghan, S. and Ryan, M.D.** (1997). The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *J. Gen. Virol.* **78**: 13-21
- Donnelly, M.L.L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L.E., Gani, D. and Ryan, M.D.** (2001a). Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: A putative ribosomal 'skip'. *J. Gen. Virol.* **82**: 1013-1025
- Donnelly, M.L.L., Hughes, L.E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D. and Ryan, M.D.** (2001b). The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J. Gen. Virol.* **82**: 1027-1041
- Donson, J., Kearney, C.M., Hilf, M.E. and Dawson, W.O.** (1991). Systemic expression of a bacterial gene by tobacco mosaic virus-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7204-7208
- Dougherty, W.G., Willis, L. and Johnston, R.F.** (1985). Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology* **144**: 66-72
- Dougherty, W.G., Lindbo, J.L., Smith, H.A., Parks, T.D., Swaney, S. and Proebsting, W.M.** (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: Exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 544-552
- Edwards, S.J., Hayden, M.B., Hamilton, R.C., Haynes, J.A., Nisbet, I.T. and Jagadish, M.N.** (1994). High level production of potyvirus-like particles in insect cells infected with recombinant baculovirus. *Arch. Virol.* **136**: 375-380
- Elmer, S. and Rogers, S.G.** (1990). Selection of wild-type size derivatives of tomato golden mosaic virus during systemic infection. *Nucleic Acids Research* **18**: 2001-2006
- Endo, Y. and Tsurugi, K.** (1987). RNA N-glucosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* **262**: 8128-8130
- Erhardt, M., Herzog, E., Lauber, E., Fritsch, C., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Bouzoubaa, S.** (1999a). Transgenic plants expressing the TGB1 of peanut clump virus complement movement of TGB1-defective peanut clump virus but not of TGB1-defective beet necrotic yellow vein virus. *Plant Cell Rep.* **18**: 614-619
- Erhardt, M., Stussi-Garaud, C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G. and Bouzoubaa, S.** (1999b). The first triple gene block protein of peanut clump virus localizes to the plasmodesmata during virus infection. *Virology* **264**: 220-229
- Fakhfakh, H., Vilaine, F., Makni, M. and Robaglia, C.** (1996). Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. *J. Gen. Virol.* **77**: 519-523
- Farinelli, L. and Malnoë, P.** (1993). Coat protein gene-mediated resistance to potato virus Y in tobacco: Examination of the resistance mechanisms - Is the transgenic coat protein required for protection? *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 284-292
- Fecker, L.F., Koenig, R. and Obermeier, C.** (1997). Nicotiana benthamiana plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in late stages of infection. *Arch. Virol.* **142**: 1857-1863
- Fedorkin, O.N., Solovyev, A.G., Yelina, N.E., Zamyatin, A.A., Zinovkin, R.A., Mäkinen, K., Schiemann, J. and Morozov, S.Y.** (2001). Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein. *J. Gen. Virol.* **82**: 449-458
- Fedorkin, O.N., Merits, A., Lucchesi, J., Solovyev, A.G., Saarma, M., Morozov, S.Y. and Mäkinen, K.** (2000). Complementation of the movement-deficient mutations in potato virus X: Potyvirus coat protein mediates cell-to-cell trafficking of C-terminal truncation but not deletion mutant of potyvirus coat protein. *Virology* **270**: 31-42

- Fehér, A., Skryabin, K.G., Balász, E., Preiszner, J., Shulga, O.A., Zakharyev, V.M. and Dudits, D.** (1992). Expression of PVX coat protein gene under control of extensin-gene promotor confers virus resistance on transgenic potato plants. *Plant Cell Rep.* **11**: 48-52
- Fernández, K.S.V., Sabelli, P.A., Barrat, D.H., Richardson, M., Xavier-Filho, J. and Shewry, P.R.** (1993). The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Mol. Biol.* **23**: 215-219
- Fernández-Fernández, M.R., Mouriño, M., Rivera, J., Rodríguez, F., Plana-Durán, J. and García, J.A.** (2001). Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology* **280**: 283-291
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275-298
- Fraenkel-Conrat, H. and Williams, R.C.** (1955). Reconstruction of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **41**: 690-698
- French, R., Janda, M. and Ahlquist, P.** (1986). Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: Efficient expression in monocotyledonous plant cells. *Science* **231**: 1294-1297
- Fulton, R.W.** (1986). Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 67-81
- Futterer, J., Bonneville, J.M. and Hohn, T.** (1990). Cauliflower mosaic virus as a gene expression vector for plants. *Physiologia Plantarum* **79**: 154-157
- Gadani, F., Mansky, L.M., Medici, R., Miller, W.A. and Hill, J.H.** (1990). Genetic engineering of plant virus resistance. *Arch. Virol.* **115**: 1-21
- German-Retana, S., Candresse, T., Alias, E., Delbos, R.P., Le Gall, O.** (2000). Effects of green fluorescent protein or  $\beta$ -glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 316-324
- Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G.** (1992). Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA2. *Virology* **189**: 40-47
- Golemboski, D.B., Lomonossoff, G.P. and Zaitlin, M.** (1990). Plants transformed with tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6311-6315
- Goodwin, J., Chapman, K., Swaney, S., Parks, T.D., Wernsman, E.A. and Dougherty, W.G.** (1996). Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* **8**: 95-105
- Gopinath, K., Wellink, j., Porta, C., Taylor, K.M., Lomonossoff, G.P. and van Kammen, A.** (2000). Engineering cowpea mosaic virus RNA-2 into a vector to express heterologous proteins in plants. *Virology* **267**: 159-173
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. and Blinov, V.M.** (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Letters* **235**: 16-24
- Gorbalenya, A.E. and Koonin, E.V.** (1989). Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. *Nucleic Acids Research* **17**: 8413-8440
- Gorbalenya, A.E. and Koonin, E.V.** (1993). Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Opin. Cell Biol.* **3**: 419-429
- Goulden, M.G., Davies, J.W., Wood, K.R. and Lomonossoff, G.P.** (1992). Structure of tobnaviral particles: A model suggested from sequence conservation in tobnaviral and tobamoviral coat proteins. *J. Mol. Biol.* **227**: 1-8
- Grass, S. and Shepherd, R.J.** (1978). Isolation and partial characterization of virus inhibitors from plant species taxonomically related to *Phytolacca*. *Phytopathology* **68**: 199-205
- Green, P.J.** (1993). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiol.* **102**: 1065-1070
- Gronenboom, B., Gardner, R.C., Schaefer, S. and Shepherd, R.J.** (1981). Propagation of foreign DNA in plants using cauliflower mosaic virus as vector. *Nature* **294**: 773-776
- Guilford, P.J., Ziegler-Graff, V. and Baulcombe, D.C.** (1991). Mutation and replacement of the 16 k-Da protein gene in RNA-1 of tobacco rattle virus. *Virology* **182**: 607-614

- Guo, H.S., López-Moya, J.J. and García, J.A.** (1998). Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric plum pox potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *Virus Research* **57**: 183-195
- Gutierrez-Campos, R., Torres-Acosta, J.A., Saucedo-Arias, L.J. and Gomez-Lim, M.A.** (1999). The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotechnology* **17**: 1223-1225
- Hackland, A.F., Rybicki, E.P. and Thomson, J.A.** (1994). Coat protein-mediated resistance in transgenic plants. *Arch. Virol.* **139**: 1-22
- Hamamoto, H., Sugiyama, Y., Nakagawa, N., Hashida, E., Matsunaga, Y., Tajikemoto, S., Watanabe, Y. and Okada, Y.** (1993). A new tobacco mosaic virus vector and its use for the systemic production of angiotensin-I-converting enzyme inhibitor in transgenic tobacco and tomato. *Bio/Technology* **11**: 930-932
- Hamilton, R.I.** (1980). Defenses triggered by previous invaders: Viruses. *Plant Dis.* 1977-1980, **5**: 279-303
- Hamilton, W.D.O. and Baulcombe, D.C.** (1989). Infectious RNA produced by in vitro transcription of a full-length tobacco rattle virus RNA1 cDNA. *J. Gen. Virol.* **70**: 963-968
- Hammond, J. and Kamo, K.K.** (1995). Effective resistance to potyvirus infection conferred by expression of antisense RNA in transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 674-682
- Hammond-Kosack, K.E., Staskawicz, B.J., Jones, J.D.G. and Baulcombe, D.C.** (1995). Functional expression of a fungal avirulence gene from a modified potato virus X genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 181-185
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense response. *Plant Cell* **8**: 1773-1791
- Hanahan, D.** (1985). In: DNA Cloning, Vol. 1, Glover, D., ed., IRL Press Ltd., London UK
- Hartley, M.R., Legname, G., Osborn, R., Chen, Z. and Lord, M.** (1991). Single-chain ribosome inactivating proteins from plants depurinate Escherichia coli 23S ribosomal RNA. *FEBS Letters* **290**: 65-68
- Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C. and Hodge, S.** (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2122-2127
- Hayes, R.J., Petty, I.T.D., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W.** (1988). Gene amplification and expression in plants by a replicating geminivirus. *Nature* **334**: 179-182
- Hayes, R.J., Coutts, R.H.A. and Buck, K.W.** (1989). Stability and expression of bacterial genes in replicating geminivirus vectors in plants. *Nucleic Acids Research* **17**: 2391-2403
- Hefferon, K.L., Doyle, S. and AbouHaidar, M.G.** (1997). Immunological detection of the 8k protein of potato virus X (PVX) in cell walls of PVX-infected tobacco and transgenic potato. *Arch. Virol.* **142**: 425-433
- Hemenway, C., Fang, R.X., Kaniewski, W., Chua, N.H. and Tumer, N.E.** (1988). Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.* **7**: 1273-1280
- Herzog, E., Hemmer, O., Hauser, S., Meyer, G., Bouzoubaa, S. and Fritsch, C.** (1998). Identification of genes involved in replication and movement of peanut clump virus. *Virology* **248**: 312-322
- Hirochika, H. and Hayashi, K.** (1991). A new strategy to improve a cauliflower mosaic virus vector. *Gene* **105**: 239-241
- Hoekema, A., Huisman, M.J., Molendijk, L., van den Elzen, P.J.M. and Cornelissen, B.J.C.** (1989). The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X. *Bio/Technology* **7**: 273-278
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. and Winter G.** (1991). Multisubunit proteins on the surface of filamentous phage: Methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* **19**: 4133-4137
- Hong, Y., Saunders, K., Harley, M.R. and Stanley, J.** (1996). Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of dianthin transgenic plants. *Virology* **220**: 119-127



- Huisman, M.J., Linthorst, H.J.M., Bol, J.F. and Cornelissen, B.J.C.** (1988). The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **69**: 1789-1798
- Hull, R.** (1970). Studies on alfalfa mosaic virus. III: Reversible dissociation and reconstruction studies. *Virology* **40**: 34-47
- Hull, R. and Davies, J.W.** (1992). Approaches to nonconventional control of plant virus disease. *Crit. Rev. Plant Sci.* **11**: 17-33
- Hwang, D.J., Roberts, I.M. and Wilson, T.M.A.** (1994). Expression of tobacco mosaic virus coat protein and assembly of pseudovirus particles in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9067-9071
- Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D.C. and Malnoë, P.** (1997). Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *J. Gen. Virol.* **78**: 3141-3145
- Jagadish, M.N., Ward, C.W., Gough, K.H., Tulloch, P.A., Wittaker, L.A. and Shukla, D.D.** (1991). Expression of potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **72**: 1543-1550
- Jagadish, M.N., Huang, D. and Ward, C.W.** (1993). Site-directed mutagenesis of a potyvirus coat protein and its assembly in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* **74**: 893-896
- Joelson, T., Akerblom, L., Oxelfeldt, P., Strandberg, B., Tomenius, K. and Morris, T.J.** (1997). Presentation of foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J. Gen. Virol.* **78**: 1213-1217
- Johansen, E.** (1996). Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12400-12405
- Jones, A.L., Johansen, I.E., Bean, S.J., Bach, I. and Maule, A.J.** (1998). Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *J. Gen. Virol.* **79**: 3129-3137
- Joshi, R.L., Joshi, V. and Ow, D.** (1990). BSMV genome mediated expression of a foreign gene in dicot and monocot plant cells. *EMBO Journal* **9**: 2663-2669
- Jupin, I., Richards, K., Jonard, G., Guilley, H. and Pleij, W.** (1990). Mapping sequences required for productive replication of beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Virology* **178**: 273-280
- Jupin, I., Guilley, H., Richards, K.E. and Jonard, G.** (1992). Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influences symptom phenotype on leaves. *EMBO Journal* **11**: 479-488
- Kalinina, N.O., Fedorkin, O.N., Samuilova, O.V., Maiss, E., Korpela, T., Morozov, S. and Atabekov, J.G.** (1996) Expression and biochemical analyses of the recombinant potato virus X 25k movement protein. *FEBS Letters* **397**: 75-78
- Kaniewski, W., Lawson, C., Sammons, B., Haley, L., Hart, J., Delanny, X. and Tumer, N.E.** (1990). Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. *Bio/Technology* **8**: 750-754
- Karrer, E.E., Beachy, R.N. and Holt, C.A.** (1998). Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. *Plant Mol. Biol.* **36**: 681-690
- Kavanagh, T., Goulden, M., Santa Cruz, S., Chapman, S., Barker, I. and Baulcombe D.C.** (1992). Molecular analysis of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Virology* **189**: 609-617
- Kawchuck, L.M., Martin, R.R. and McPherson, J.** (1990). Resistance in transgenic potato expressing the potato leaf roll virus coat protein gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 301-307
- Kawchuck, L.M., Martin, R.R. and McPherson, J.** (1991). Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leaf roll virus in Russet Burbank potato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**: 247-253
- Kearney, C.M., Donson, J., Jones, G.E. and Dawson, W.O.** (1993). Low level of genetic drift in foreign sequences replicating in an RNA virus in plants. *Virology* **192**: 11-17
- Keen, N.T.** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**: 447-463

- Kobayashi, K., Cabral, S., Calamante, G., Maldonado, S. and Mentaberry, A.** (2001). Transgenic tobacco plants expressing the potato virus X open reading frame 3 gene develop specific resistance and necrotic ring symptoms after infection with the homologous virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1274-1285
- Koenig, R., Lüddecke, P. and Haeberlé, A.M.** (1995). Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-stranded polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *J. Gen. Virol.* **76**: 2051-2055
- Koenig, R., Commandeur, U., Loss, S., Beier, C., Kaufmann, A. and Lesemann, D.E.** (1997). Beet soil-borne virus RNA2: Similarities and dissimilarities to the coat protein gene-carrying RNAs of other furoviruses. *J. Gen. Virol.* **78**: 469-477
- Koonin, E.V. and Dolja, V.V.** (1993). Evolution and Taxonomy of positiv-strand RNA viruses: Implication of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 375-430
- Korowski, U.** (2001). Untersuchung zur Bildung virus-ähnlicher Partikel nach Expression der Hüllprotein-Gene von Furo-, Pomo- und Benyviren durch ganzlängige virale cDNA-Klone in Pflanzen. *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Arbeitsgruppe R. Koenig (Diplomarbeit)*
- Kumagai, M.H., Turpen, T.H., Weinzettl, N., Delle-Cioppa, G., Turpen, A.M., Donson, J., Hilf, M.E., Grantham, G.L., Dawson, W.O., Chow, T.P., Piatak, M. and Grill, L.K.** (1993). Rapid, high-level expression of biologically active  $\alpha$ -Trichosanthin in transfected plants by an RNA viral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 427-430
- Kumagai, M.H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K. and Grill, L.K.** (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 1679-1683
- Kumagai, M.H., Keller, Y., Bouvier, F., Clary, D. and Camara, B.** (1998). Functional integration of non-native carotenoids into chloroplasts by viral-derived expression of capsanthin-capsorubin synthetase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* **14**: 305-315
- Kunik, T., Salomon, R., Zamir, D., Navot, N., Zeidan, M., Michalson, I., Gafni, Y. and Czosnek, H.** (1994). Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Bio/Technology* **12**: 500-504
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**: 203-209
- Laemmli, U.K.** (1970). Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* **227** : 680
- Lam, Y.H., Wong, Y.S., Wang, B., Wong, R.N.S., Yeung, H.W. and Shaw, P.C.** (1996). Use of trichosanthin to reduce infection by turnip mosaic virus. *Plant Sci.* **114**: 111-117
- Lapidot, M., Gafny, R., Ding, B., Wolf, S., Lukas, W.J. and Beachy, R.N.** (1993). A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant Journal* **4**: 959-970
- Lauber, E., Bleykasten-Grosshans, C., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Jonard, G., Richards, K. and Guilley, H.** (1998). Cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus. I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 618-625
- Lauber, E., Jonard, G., Guilley, H. and Gilmer, D.** (1999). Effects of structural modifications upon the accumulation in planta of replicons derived from beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Arch. Virol.* **144**: 1201-1208
- Lauber, E., Jannsens, L., Weyens, G., Jonard, G., Richards, K.E., Lefèbvre, M. and Guilley, H.** (2001). Rapid screening for dominant negative mutations in the beet necrotic yellow vein virus triple gene block proteins P13 and P15 using a viral replicon. *Transgenic research* **10**: 293-302
- Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, P., Newell, C., Sanders, P. and Tumer, N.E.** (1990). Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: Resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Bio/Technology* **8**: 127-134
- Lazarowitz, S.G. and Beachy, R.N.** (1999). Viral proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* **11**: 535-548

- Lefebvre, D.D., Miki, B.L. and Laliberte, J.F.** (1987). Mammalian metallothionein function in plants. *Biotechnology* **5**: 1053-1056
- Legorburu, F.J., Robinson, D.J., Torrance, L. and Duncan, G.H.** (1995). Antigenic analysis of nematode-transmissible and non-transmissible isolates of tobacco rattle tobavirus using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **76**: 1497-1501
- Lindbo, J.A. and Dougherty, W.G.** (1992). Pathogen-derived resistance to a potyvirus: Immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 144-153
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M. and Dougherty, W.G.** (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and viral resistance. *Plant Cell* **5**: 1749-1759
- Longstaff, M., Brigneti, G., Boccard, F., Chapman, S. and Baulcombe, D.** (1993). Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase. *EMBO Journal* **12**: 379-386
- Loesch-Fries, L.S., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L., Hill, K., Krahn, K., Jarvis, N., Nelson, S. and Halk, E.** (1987). Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO Journal* **6**: 1845-1851
- Lomonossoff, G.P.** (1995). Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 323-343
- Lomonossoff, G.P. and Johnston, J.E.** (1995). Eukaryotic viral expression systems for polypeptides. *Sem. Virol.* **6**: 257-267
- Lough, T.J., Shash, K., Xoconostle-Cazares, B., Hofstra, K.R., Beck, D.L., Balmori, E., Forster, R.L.S. and Lucas, W.J.** (1998). Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 801-814
- Lu, B., Stubbs, G. and Culver, J.N.** (1998). Coat protein interactions involved in tobacco mosaic tobamovirus cross-protection. *Virology* **248**: 188-198
- Lucas, W.J. and Gilbertson, R.I.** (1994). Plasmodesmata in relation to virus movement within leaf tissues. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 387-411
- Lucas, W.J. and Wolff, S.** (1999). Connections between virus movement, macromolecular signaling and assimilate allocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 192-197
- MacFarlane, S.A. and Davies, J.W.** (1992). Plants transformed with a region of the 201-kilodalton replicase gene from pea early browning virus RNA1 are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5829-5833
- MacFarlane, S.A. and Popovich, A.H.** (2000). Efficient expression of foreign genes in roots from tobavirus vectors. *Virology* **267**: 29-35
- Maiti, I.B., Murphy, J.F., Shaw, J.G. and Hunt, A.G.** (1993). Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6110-6114
- Malcuit, I., Marano, M.R., Kavanagh, T.A., De Jong, W., Forsyth, A. and Baulcombe, D.C.** The 25-kDa movement protein of PVX elicits Nb-mediated hypersensitive cell death in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 536-543
- Malysenko, S.I., Kondakova, O.A., Nazarova, J.V., Kaplan, I.B., Tiliansky, M.E. and Atabekov, J.G.** (1993). Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins. *J. Gen. Virol.* **74**: 1149-1156
- Masuta, C., Yamana, T., Takahasi, Y., Uyeda, I., Sato, M., Ueda, S. and Matsumura, T.** (2000). Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene-expression system for legume species. *Plant Journal* **23**: 539-546
- Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M.** (1995a). How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.* **107**: 6679-6685
- Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M.** (1995b). Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: What does it really tell us? *Trends Genet.* **11**: 1-3
- Maule, A.J.** (1991). Virus movement in infected plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **9**: 457-473

- Mayo, M.A., Brierley, K.M. and Goodman, B.A.** (1993). Developments in the understanding of the particle structure of tobnaviruses. *Biochimie* **75**: 693-644
- McCormick, A.A., Kumagai, M.H., Hanley, K., Turpen, T.H., Hakim, I., Grill, L.K., Tuse, D., Levy, S. and Levy, R.** (1999). Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 3138-3142
- McDonald, J.G., Beveridge, T.J. and Bancroft, J.B.** (1976). Self-assembly of protein from a flexuous virus. *Virology* **69**: 327-331
- McDonald, J.G. and Bancroft, J.B.** (1977). Assembly studies on potato virus Y and its coat protein. *J. Gen. Virol.* **35**: 251-263
- McKinney, H.H.** (1929). Mosaic disease in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *J. Agric. Res.* **39**: 557-578
- McLain, L., Porta, C., Lomonosoff, G.P., Durrani, Z. and Dimmock, N.J.** (1994). Human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibodies raised to a gp41 peptide expressed on the surface of a plant virus. *Aids and Human Retroviruses* **11**: 327-334
- Melcher, U.** (1990). Similarities between putative transport proteins of plant viruses. *Journal of General Virology* **71** : 1009-1018
- Meyer, P. and Saedler, H.** (1996). Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 23-48
- Miller, E.D. and Hemenway, C.** (1998). History of coat protein-mediated protection. *Methods Mol. Biol.* **81**: 25-38
- Miller, W.A., Dreher, T.W. and Hall, T.C.** (1985). Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA in vitro by internal initiation on (-) sense genomic RNA. *Nature* **313**: 68-70
- Milne, R.G. and Lesemann, D.E.** (1984). Immunosorbent electron microscopy in plant virus studies. *Methods in Virology* **8**: 85-101
- Mittler, R., Simon, L. and Lam, E.** (1997). Pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *J. Cell Sci.* **110**: 1333-1344
- Moon, Y.H., Song, S.K., Choi, K.W. and Lee, J.S.** (1997). Expression of a cDNA clone encoding *Phytolacca insularis* antiviral protein confers virus resistance on transgenic potato plants. *Mol. Cells* **7**: 807-815
- Morel, J.B. and Dangl, J.L.** (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* **4**: 671-683
- Morozov, S.Y., Lukasheva, L.I., Chernov, B.K., Skryabin, K.G. and Atabekov, J.G.** (1987). Nucleotide sequence of the open reading frames adjacent to the coat protein cistron in potato virus X genome. *FEBS Letters* **213**: 438-442
- Morozov, S.Y., Dolja, V.V. and Atabekov, J.G.** (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *Journal of Molecular Evolution* **29**: 52-62
- Morozov, S.Y., Miroshnichenko, N.A., Zelenina, D.A., Fedorkin, O.N., Solovyev, A.G., Lukasheva, L.I. and Atabekov, J.C.** (1990). Expression of RNA transcripts of potato virus X full-length and subgenomic cDNAs. *Biochimie* **72**: 677-684
- Morozov, S.Y., Miroshnichenko, N.A., Solovyev, A.G., Zelenina, D.A., Fedorkin, O.N., Lukasheva, L.I., Grachev, S.A. and Chernov, B.K.** (1991). In vitro membrane binding of the translation products of the carlavirus 7-kDa protein genes. *Virology* **183**: 782-785
- Morozov, S.Y., Fedorkin, O.N., Jüttner, G., Schiemann, J., Baulcombe, D.C. and Atabekov, J.G.** (1997). Complementation of a potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *J. Gen. Virol.* **78**: 2077-2083
- Morozov, S. and Solovyev, A.** (1999a). Genome organization in RNA viruses. In *Molecular Biology of Plant Viruses* Seite 47-98. Editiert von C.L. Mandahar. Dordrecht: Kluwer
- Morozov, S.Y., Solovyev, A.G., Kalinina, N.O., Fedorkin, O.N., Samuilova, O.V., Schiemann, J. and Atabekov, J.G.** (1999b). Evidence for two non-overlapping functional domains in the Potato virus X 25k movement protein. *Virology* **260**: 55-63

- Mueller, E., Gilbert, J., Davenport, G., Brigneti, G. and Baulcombe, D.** (1995). Homology-dependent resistance: Transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant Journal* **7**: 1001-1013
- Mullis, K., and Faloona, F.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **55** : 335-350
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15** : 473-497
- Mushegian, A.R. and Koonin, E.V.** (1993). Cell-to-cell movement of plant viruses. Insights from amino acid sequence comparisons of movement proteins and from analogies with cellular transport systems. *Arch. Virol.* **133**: 239-257
- Namba, K., Pattanayek, R. and Stubbs, G.** (1989). Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. *J. Mol. Biol.* **208**: 307-325
- Namba, S., Ling, K., Gonsalves, C., Slightom, J.L. and Gonsalves, D.** (1992). Protection of transgenic plants expressing the coat protein gene of watermelon mosaic virus II or zucchini yellow mosaic virus against six potyviruses. *Phytopathology* **82**: 940-946
- Nicholson, A.W.** (1996). Structure, reactivity, and biology of double-stranded RNA. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **52**: 1-65
- Nida, D.L., Anjos, R.J., Lomonossoff, G.P. and Ghabrial, S.A.** (1992). Expression of cowpea mosaic virus coat protein precursor in transgenic tobacco plants. *J. Gen. Virol.* **73**: 157-163
- Noordam, D.** (1956). Waardplanten en toetsplanten van het ratelvirus van de tabak. *Tijdschr. Plantenziekten* **62**: 219
- O'Brien, G.J., Bryant, C.J., Voogd, C., Greenberg, H.B., Gardner, R.C. and Bellamy, A.R.** (2000). Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into virus-like particles. *Virology* **270**: 444-453
- Ogawa, T., Hori, T. and Ishida, I.** (1996). Virus-induced cell death in plants expressing mammalian 2'-5' oligoadenylate system. *Nature Biotechnology* **14**: 1566-1569
- Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Santa Cruz, S., Roberts, I., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N. and Epel, B.** (1999) Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**: 743-754
- Osborn, J.K., Watts, J.W., Beachy, R.N. and Wilson, T.M.A.** (1989). Evidence that nucleocapsid disassembly and a later step in virus replication are inhibited in transgenic tobacco protoplasts expressing TMV coat protein. *Virology* **172**: 370-373
- Palmer, K.E., Arntzen, C.J. and Lomonossoff, G.P.** (1999). Antigen delivery systems: Transgenic plants and recombinant plant viruses. In *Mucosal Immunity*, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, Orlando, Seiten 793-807
- Palukaitis, P. and Zaitlin, M.** (1984). A model to explain the cross-protection phenomenon shown by plant viruses and viroids. In *Plant-Microbe Interaction: Molecular and Genetic Perspectives* (T. Kosuge and E.W. Nester, Eds.) Seiten 420-429 Macmillan, New York
- Palukaitis, P. and Zaitlin, M.** (1997). Replicase-mediated resistance to plant virus disease. *Adv. Virus Research* **48**: 349-377
- Petty, I.T.D. and Jackson, A.O.** (1990). Mutational analysis of barley stripe mosaic virus RNA $\beta$ . *Virology* **179**: 712-718
- Ploeg, A.T., Brown, D.J.F. and Robinson, D.J.** (1989). Transmission of Tobraviruses by trichodoriid nematodes. *EPPO Bull.* **19**: 605-610
- Ponz, F. and Bruening, G.** (1986). Mechanisms of resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**: 355-381
- Porta, C., Spall, V.E., Loveland, J., Johnston, J.E., Barker, P.J. and Lomonossoff, G.P.** (1994). Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* **202**: 949-955
- Powell-Abel, P.A., Nelson, R.S., De, B., Hoffman, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T. and Beachy, R.N.** (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**: 738-743

- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J.** (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111** : 229-233
- Prestle, J., Schoenfelder, M., Adam, G., and Mundry, K.W.** (1992). Type 1 ribosome-inactivating proteins depurinate plant 25S rRNA without species specificity. *Nucleic Acids Research* **20**: 3179-3182
- Quillet, L., Guillet, H., Jonard, G. and Richards, K.** (1989). In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* **172**: 293-301
- Ratcliff, F.G., Harrison, B.D. and Baulcombe, D.C.** (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**: 1558-1560
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A. and Baulcombe, D.C.** (1999). Gene silencing without DNA:RNA mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**: 1207-1215
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M. and Baulcombe, D.C.** (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant Journal* **25**: 237-245
- Register, J.C. III and Beachy, R.N.** (1989). Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* **166**: 524-532
- Reichel, C., Mathur, J., Eckes, P., Langenkemper, K., Koncz, C., Schell, J., Reiss, B. and Maas, C.** (1996). Enhanced green fluorescence by expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** : 5888-5893
- Reimann-Philipp, U.** (1998). Mechanisms of resistance. Expression of coat protein. *Methods Mol. Biol.* **81**: 521-532
- Reimann-Philipp, U. and Beachy, R.N.** (1993). Coat protein-mediated resistance in transgenic tobacco expressing the tobacco mosaic virus coat protein from tissue-specific promoters. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 323-330
- Reusken, C.B.E.M., Neeleman, L. and Bol, J.F.** (1994). The 3'-untranslated region of alfalfa mosaic virus RNA-3 contains at least 2 independent binding-sites for viral coat protein. *Nucleic Acids Research* **22**: 1346-1353
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S. and Casse-Delbart, F.** (1989). Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* **70**: 935-947
- Rommens, C.M.T., Salmeron, J.M., Baulcombe, D.C. and Staskawicz, B.J.** (1995). Use of a gene expression system based on potato virus X to rapidly identify and characterize a tomato Pto homolog that controls fenthion sensitivity. *Plant Cell* **7**: 249-257
- Rouleau, M., Smith, R.J., Bancroft, J.B. and Mackie, G.A.** (1994). Purification, properties, and subcellular localization of foxtail mosaic potexvirus 26 k-Da protein. *Virology* **204**: 254-265
- Rubino, L., Lupo, R. and Russo, M.** (1993). Resistance to cymbidium ringspot virus infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing full-length viral replicase gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 729-734
- Rubino, L. and Russo, M.** (1995). Characterization of resistance to cymbidium ringspot virus in transgenic plants expressing a full-length viral replicase gene. *Virology* **212**: 240-243
- Ruiz, M.T., Voinnet, O. and Baulcombe, D.C.** (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**: 937-946
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and Hunt, M.D.** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Ryan, D.M. and Drew, J.** (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO Journal* **13**: 928-933
- Ryan, M.D., King, A.M.Q. and Thomas, G.P.** (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J. Gen. Virol.* **72**: 2727-2732
- Rybicki, E.P.** (1986). Affinity purification of specific antibodies from plant virus capsid protein immobilised on nitrocellulose. *J. Phytopathology* **116**: 30-38

- Sablowski, R.W., Baulcombe, D.C. and Bevan, M.** (1995). Expression of a flower-specific Myb protein in leaf cells using a viral vector causes ectopic activation of a target promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6901-6905
- Saito, T., Yamanaka, K. and Okada, Y.** (1990). Long distance movement and viral assembly of tobacco mosaic mutants. *Virology* **176**: 329-336
- Saitoh, H., Kiba, A., Nishihara, M., Yamamura, S., Suzuki, K. and Terauchi, R.** (2001). Production of antimicrobial defensin in *Nicotiana benthamiana* with a potato virus X vector. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 111-115
- Sallustio, S. and Stanley, P.** (1990). Isolation of chinese hamster ovary ribosomal mutants differentially resistant to ricin, abrin, and modeccin. *J. Biol. Chem.* **265**: 582-588
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*
- Sanford, J.C. and Johnston, S.A.** (1985). The concept of parasite-derived resistance: Deriving resistance genes from parasite's own genome. *J. Theor. Biol.* **113**: 395-405
- Sanford, J.C., De Vit, M.J., Smith, F.D., Harpending, P.R., Roy, M.K. and Johnston, S.A.** (1991). An improved, helium-driven biolistic device. *Technique* **3**: 3-16
- Santa Cruz, S. and Baulcombe, D.C.** (1993). Molecular analysis of potato virus X isolates in relation to the potato hypersensitivity gene *Nx*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 707-714
- Santa Cruz, S., Chapman, S., Roberts, A.G., Roberts, I.M., Prior, D.A.M. and Oparka, K.J.** (1996). Assembly and movement of a plant virus carrying a green fluorescent protein overcoat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6286-6290
- Santa Cruz, S., Roberts, A.G., Prior, D.A.M., Chapman, S. and Oparka, K.J.** (1998). Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X: The role of the virions. *Plant Cell* **10**: 495-510
- Sasaya, T., Torrance, L., Cowan, G., and Ziegler, A.** (2000). Aphid transmission studies using helper component proteins of potato virus Y expressed from a vector derived from potato virus X. *J. Gen. Virol.* **81**: 1115-1119
- Schenk, P.M., Baumann, S., Mattes, R. and Steinbiss, H.H.** (1995). Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA Polymerase and rare <sup>Arg</sup>tRNAs. *BioTechniques* **19**: 196-200
- Schmelzer, K.** (1957). Untersuchungen über den Wirtspflanzenkreis des Tabakmauche-Virus. *Phytopathologische Zeitschrift* **30**: 281
- Schmidt, K. and Koenig, R.** (1999). Genetic analysis of large-sized RNA2 species of a TCM-like tobacco rattle virus source from spinach. *Arch. Virol.* **144**: 503-511
- Schmitt, C., Balmori, E., Jonard, G., Richard, K.E. and Guilley, H.** (1992). In vitro mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA2: Evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5715-5719
- Scholthoff, H.B., Morris, T.J. and Jackson, A.O.** (1993a). The capsid protein gene of tomato bushy stunt virus is dispensable for systemic movement and can be replaced for localized expression of foreign genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 309-322
- Scholthof, K.B.G., Scholthof, H.B. and Jackson, A.O.** (1993b). Control of plant virus disease by pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Plant Physiol.* **102**: 7-12
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B.G. and Jackson, A.O.** (1995). Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell* **7**: 1157-1172
- Semancik, J.S. and Reynolds, D.A.** (1969). Assembly of protein and nucleoprotein particles from extracted tobacco rattle virus protein and RNA. *Science* **164**: 559-560
- Seppänen, P., Puska, R., Honkanen, J., Tyulkina, L.G., Fedorkin, O., Morozov, S.Y. and Atabekov, J.G.** (1997). Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. *J. Gen. Virol.* **78**: 1241-1246
- Shanks, M. and Lomonosoff, G.P.** (2000). Co-expression of the capsid proteins of cow pea mosaic virus in insect cells leads to the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* **81**: 3039-3097

- Sherwood, J.L.** (1987). Demonstration of the specific involvement of coat protein in tobacco mosaic virus (TMV) cross protection using a TMV coat protein mutant. *J. Phytopathol.* **118**: 358-362
- Sherwood, J.L. and Fulton, R.W.** (1982). The specific involvement of coat protein in tobacco mosaic (TMV) cross protection. *Virology* **119**: 150-158
- Shivprasad, S., Pogue, G.P., Lewandowski, D.J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L.K. and Dawson, W.O.** (1999). Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology* **255**: 312-323
- Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. and Ward, C.W.** (1988). The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains major virus-specific epitopes. *J. Gen. Virol.* **69**: 1497-1508
- Shukla, D.D. and Ward, C.W.** (1989a). Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Arch. Virol.* **106**: 171-200
- Shukla, D.D., Tribbick, G., Mason, T.J., Hewish, D.R., Geysen, H.M. and Ward, C.W.** (1989b). Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8192-8196
- Shukla, D.D. and Ward, C.W.** (1989c). Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virus Research* **36**: 273-315
- Sijen, T., Wellink, J., Hendriks, J., Verver, J. and Van Kammen, A.** (1995). Replication of cowpea mosaic virus RNA1 and RNA2 is specifically blocked in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing full-length replicase or movement protein genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 340-347
- Silva-Rosales, L., Lindbo, J.A. and Dougherty, W.G.** (1994). Analysis of transgenic tobacco plants expressing a truncated form of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Plant Mol. Biol.* **24**: 929-939
- Singh, S., Rothnagel, R., Prasad, B.V. and Buckley, B.** (1995). Expression of tobacco ringspot virus capsid protein and satellite RNA in insect cells and three-dimensional structure of tobacco ringspot virus-like particles. *Virology* **213**: 472-481
- Skryabin, K.G., Morozov, S.Y., Kraev, A.S., Rozanov, M.N., Chernov, B.K., Lukasheva, L.I. and Atabekov, J.G.** (1988). Conserved and variable elements in RNA genomes of potexviruses. *FEBS Letters* **240**: 33-40
- Sleat, D.F., Gallie, D.R., Watts, J.W., Deom, C.M., Turner, P.C., Beachy, R.N. and Wilson, T.M.A.** (1989). Selective recovery of target gene transcripts in virus-like particles of TMV-infected transgenic tobacco. *Nucleic Acids Research* **16**: 3127-3140
- Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A. and Dougherty, W.G.** (1994). Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* **6**: 1441-1453
- Solovyev, A.G., Savenov, E.I., Agranovsky, A.A. and Morozov, S.Y.** (1996). Comparisons of the genomic cis-elements and coding regions in RNA $\beta$  components of the hordeivirus barley stripe mosaic virus, lynchis ringspot virus, and poa semilatifolius virus. *Virology* **219**: 9-18
- Solovyev, A.G., Savenko, E.I., Grdzlishvili, V.Z., Kalinina, N.O., Morozov, S.Y., Schiemann, J. and Atabekov, J.G.** (1999). Movement of hordeivirus hybrids with exchanges in the triple gene block. *Virology* **253**: 278-287
- Solovyev, A.G., Stroganova, T.A., Zamyatnin Jr., A.A., Fedorkin, O.N., Schiemann, J. and Morozov, S.Y.** (2000). Subcellular sorting of small membrane-associated triple gene block proteins: TGBp3-assisted targeting of TGBp2. *Virology* **269**: 113-127
- Spillane, C., Verchot, J., Kavanagh, T.A. and Baulcombe, D.C.** (1997). Concurrent suppression of virus replication and rescue of movement-defective virus in transgenic plants expressing the coat protein of potato virus X. *Virology* **236**: 76-84
- Stark, D.M. and Beachy, R.N.** (1989). Protection against potyvirus infection in transgenic Plants: evidence of broad spectrum resistance. *Biotechnology* **7**: 1257-1262
- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M. and Lippi, D.A.** (1992). Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and future prospects. *Bio/Technol.* **10**: 405-412
- Stram, Y., Sela, I., Edelbaum, O., Tanne, E., Karchi, M. and Karchi, H.** (1993). Expression and assembly of the potato virus Y (PVY) coat protein (CP) in *Escherichia coli* cells. *Virus Research* **28**: 29-35



- Studier, F.W. and Moffatt, B.A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H. and Dunn, J.J.** (1990). Use of T7 polymerase to direct the expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**: 60-89
- Sudarshana, M.R. and Berger, P.H.** (1998). Nucleotide sequence of both genomic RNAs of a North American tobacco rattle virus isolate. *Arch. Virol.* **143**: 1535-1544
- Tacke, E., Salamini, F., and Rohde, W.** (1996). Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nature of Biotechnology* **14** : 1597-1601
- Takahashi, Y., Takahashi, T. and Uyeda, I.** (1997). A cDNA clone to clover yellow vein potyvirus genome is highly infectious. *Virus Genes* **14**: 235-243
- Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T. and Okada, Y.** (1987). Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV RNA. *EMBO Journal* **6**: 307-311
- Tamai, A. and Meshi, T.** (2001). Cell-to-cell movement of potato virus X: The role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the Triple gene block. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 1158-1167
- Taschner, P.E.M., Van Marle, G., Brederode, F.T., Tumer, N.E. and Bol, J.F.** (1994). Plants transformed with a mutant alfalfa mosaic virus coat protein gene are resistant to the mutant but not to wild-type virus. *Virology* **203**: 269-276
- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattanco, A. and Galeffi, P.** (1993). Transgenic plants expressing a functional single-chain antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* **366**: 469-472
- Tenllado, F., Garcia-Luque, I., Serra, M.T. and Diaz-Ruiz, J.R.** (1995). Nicotiana benthamiana plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. *Virology* **211**: 170-183
- Tenllado, F., Garcia-Luque, I., Serra, M.T. and Diaz-Ruiz, J.R.** (1996). Resistance to pepper mild mottle tobamovirus conferred by 54-kDa gene sequence in transgenic plants does not require expression of wild-type 54-kDa protein. *Virology* **219**: 330-335
- Tinker, N.A., Fortin, M.G. and Mather, D.E.** (1993). Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 976-984
- Tobais, C.M., Oldroyd, G.E., Chang, J.H. and Staskawicz, B.J.** (1999). Plants expressing Pto disease resistance gene confer resistance to recombinant PVX containing the avirulence gene AvrPto. *Plant Journal* **17**: 41-50
- Töpfer, R., Maas, C., Höricke-Grandpierre, C., Schell, J. and Steinbiss, H.H.** (1993). Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Methods in Enzymology* **217**: 66-78
- Tomlinson, J.A., Walker, V.M., Flewett, T.H. and Barclay, G.R.** (1974). The inhibition of infection by cucumber mosaic virus and influenza virus by extracts from *Phytolacca americana*. *J. Gen. Virol.* **22**: 225-232
- Toth, R.L., Chapman, S., Carr, F. and Santa Cruz, S.** (2001). A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors. *FEBS Letters* **489**: 215-219
- Truve, E., Aaspõllu, A., Honkanen, J., Puska, R., Mehto, M., Hassi, A., Teeri, T.H., Kelve, M., Seppänen, P. and Saarma, M.** (1993). Transgenic tobacco plants expressing mammalian 2'-5' oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions. *Bio/Technol.* **11**: 1048-1052
- Truve, E., Kelve, M., Aaspõllu, A., Kuusksalu, A., Seppänen, P. and Saarma, M.** (1994). Principles and background for the construction of transgenic plants displaying multiple virus resistance. *Arch. Virol. Suppl.* **9**: 41-51
- Tschauder, S.** (2000). Untersuchungen zur Eignung eines cDNA-Klones des Clover yellow vein virus als Vektor für die Expression von Fremdgenen in Pflanzen. *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Arbeitsgruppe R. Koenig (Diplomarbeit)*
- Turk, V. and Bode, W.** (1991). The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters* **285**: 213-219

- Tumer, N.E., Hwang, D.J. and Bonness, M.** (1997). C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3866-3871
- Uhde, K., Koenig, R. and Lesemann, D.E.** (1998). An onion isolate of tobacco rattle virus: reactivity with an antiserum to Hypochoeris mosaic virus, a putative furovirus, and molecular analysis of its RNA2. *Arch. Virol.* **143**: 1041-1053
- Uschdraweit, H.A. and Valentin, H.** (1956). Das Tabakmauchevirus an Zierpflanzen. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **8**: 132
- Usha, R., Rohil, J.B., Spall, V.E., Shanks, M., Maule, A.J., Johnston, J.E. and Lomonossoff, G.P.** (1993). Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* **197**: 366-374
- Van der Vlugt, R.A., Ruiter, R.K. and Goldbach, R.** (1992). Evidence of sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol. Biol.* **20**: 631-639
- Van der Vlugt, R.A.A., Ruiter, R.K. and Goldbach, R.W.** (1996). Evidence of sense RNA-mediated protection to PVY<sup>N</sup> in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol. Biol.* **20**: 631-639
- Van Dun, C.M.P. and Bol, J.F.** (1988). Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resists infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. *Virology* **167**: 649-652
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. and Schell, J.** (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**: 169-170
- Vardi, E., Sela, I., Edelbaum, O., Livneh, O., Kuznetsova, L. and Stram, Y.** (1993). Plants transformed with a cistron of a potato virus Y protease (NIa) are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7513-7517
- Varrelmann, M. and Maiss, E.** (2000). Mutations of the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **81**: 567-576
- Verch, T., Yusibov, V. and Koprovski, H.** (1998). Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J. Immunol. Methods* **220**: 26-75
- Verchot, J., Angell, S.M. and Baulcombe, D.C.** (1998). In vivo translation of the triple gene block of potato virus X requires to subgenomic mRNAs. *J. Virol.* **72**: 8316-8320
- Verver, J., Wellink, J., Lent, J.V., Gopinath, K. and Kammen A.** (1998). Studies on the movement of cowpea mosaic virus using green fluorescent protein. *Virology* **242**: 22-27
- Virus Taxonomy:** Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Academic Press*
- Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H.J., Liao, Y.C., Kreuzaler, F., and Fischer, R.** (1995). Reduced virus infectivity in *N. tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody. *Mol. Breed.* **1**: 39-50
- Waldron, C., Wegrich, L.M., Merlo, P.A.O. and Walsh, T.A.** (1993). Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. *Plant Mol. Biol.* **23**: 801-812
- Wang, P., Zoubenko, O. and Tumer, N.E.** (1998). Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein II. *Plant Mol. Biol.* **38**: 957-964
- Ward, A., Etessami, P. and Stanley, J.** (1988). Expression of a bacterial gene in plants mediated by infectious geminivirus DNA. *EMBO Journal* **7**: 1583-1587
- Wassenegger, M. and Pélissier, T.** (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Mol. Biol.* **37**: 349-362
- Watanabe, Y., Ogawa, T., Takahashi, H., Ishida, I., Takeuchi, Y., Yamamoto, M. and Okada, Y.** (1995). Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease. *FEBS Letters* **372**: 165-168

- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B.** (1994). The product of the tobacco mosaic resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**: 1101-1115
- Whitham, S., McCormick, S. and Baker, B.** (1996). The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8776-8781
- Wigdorovitz, A., Perez Filgueira, D.M., Robertson, N., Carrillo, C., Sadir, A.M., Morris, T.J. and Borca, M.V.** (1999). Protection of mice against challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology* **264**: 85-91
- Wilson, T.M.A.** (1993). Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3134-3141
- Wisniewski, L.A., Powell, P.A., Nelson, R.S. and Beachy, R.N.** (1990). Local and systemic spread of tobacco mosaic virus in transgenic tobacco. *Plant Cell* **2**: 559-567
- Wittner, A., Palkovics, L. and Balázs, E.** (1998). Nicotiana benthamiana plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Research* **53**: 97-103
- Wu, X., Beachy, R.N., Wilson, T.M.A. and Shaw, J.G.** (1990). Inhibition of uncoating of tobacco mosaic virus particles in protoplasts from transgenic tobacco plants that express viral coat protein gene. *Virology* **179**: 893-895
- Wyatt, S.D. and Shepherd, R.J.** (1969). Isolation and characterization of a virus inhibitor of *Phytolacca americana*. *Phytopathology* **59**: 1787-1794
- Yang, S.J., Revers, F., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T. and Dunez, J.** (1998). Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in *Escherichia coli* and on their infectivity to plants. *Arch. Virol.* **143**: 2443-2451
- Yang, Y., Ding, B., Baulcombe, D.C. and Verchot, J.** (2000). Cell-to-cell movement of the 25k protein of potato virus X is regulated by three other viral proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 599-605
- Yu, H.H. and Wong, S.M.** (1998). Synthesis of biologically active cDNA clones of cymbidium mosaic potexvirus using a population cloning strategy. *Arch. Virol.* **143**: 1617-1620
- Yusibov, V., Kumar, A., North, A., Johnson, J.E. and Loesch-Fries, L.S.** (1996). Purification, characterization, assembly and crystallization of assembled alfalfa mosaic virus coat protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* **77**: 567-573
- Yusibov, V., Modelska, A., Steplewski, K., Agadjanyan, M., Weiner, D. and Hooper, D.C.** (1997). Antigens produced in plants by infection with chimeric plants viruses immunized against rabies virus and HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5783-5788
- Zaitlin, M.** (1997). Replicase-mediated resistance. *Summary of Public Meeting on Virus Resistant Transgenic Plants* 24-26
- Zhang, G., Leung, C., Murdin, L., Rovinski, B. and White, K.A.** (2000). In planta expression of HIV-1 p24 protein using an RNA plant virus-based expression vector. *Molecular Biotechnology* **14**: 99-107
- Zhang, L. and French, R.** (1997). Expression of reporter genes as self-cleaving fusions with barley stripe mosaic virus coat protein. *Phytopathology* **87**: 108
- Zhao, X., Fox, J.M., Olson, N.H., Baker, T.S. and Young, M.J.** (1995). In vitro assembly of cowpea chlorotic mottle virus from coat protein expressed in *Escherichia coli* and in vitro transcribed viral cDNA. *Virology* **207**: 486-494
- Zhao, Y., Hammond, J., Tousignant, M.E. and Hammond, R.W.** (2000). Development and evaluation of a complementation-dependent gene delivery system based on cucumber mosaic virus. *Arch. Virol.* **145**: 2285-2295
- Ziegler-Graff, V., Guilford, P.J. and Baulcombe, D.C.** (1991). Tobacco rattle virus RNA-1 29k gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology* **182**: 145-155

# Lebenslauf

---

## Persönliche Daten:

**Name:** Ulrike Harr  
**Geburtsdatum:** 10. April 1973  
**Geburtsort:** Bielefeld  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch  
**Familienstand:** ledig

## Ausbildungsdaten:

**Schulbildung:** August 1979 - Juni 1983 Grundschule Lipperreihe  
Juli 1983 - Juni 1992 Städtisches Gymnasium Oerlinghausen

**Schulabschluß:** Allgemeine Hochschulreife

**Praktika:** September 1992 - Februar 1993  
Umweltzentrum Heerster Mühle e.V., Bad Salzuflen-Schötmar  
März 1993 - April 1993  
Vogelschutzverein Jordsand e.V., Helgoland  
Mai 1993 - Juli 1993  
Pflanzenzuchtbetrieb W. von Borries-Eckendorf, Zuchtabteilung Hovedissen

**Studium:** Studiengang: Diplom Biologie  
Studienbeginn: April 1993 Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Vordiplom: Mai 1995 Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Hauptdiplom: Sept. 1998 Technische Universität Braunschweig

**Berufserfahrung:** Januar 1998 - September 1998  
Diplomarbeit "Untersuchung der subzellulären Lokalisierung des mutmaßlichen Transportproteins aus BWYV"  
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA),  
Institut für Virologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit (PS),  
Labor Dr. Schiemann

November 1998 - Dezember 1998  
Wissenschaftliche Angestellte  
BBA, Institut PS, Labor Prof. Dr. Koenig

Februar 1999 - Juli 2001  
Wissenschaftliche Angestellte im Rahmen einer Promotion  
"Untersuchungen zur Eignung viraler Vollängenkclone zur Expression von Nukleinsäuresequenzen mit möglichem antiviralem Potential in Pflanzen"  
BBA, Institut PS, Labor Prof. Dr. Koenig

seit August 2001  
Wissenschaftliche Angestellte  
BBA, Institut PS, Labor Dr. Schiemann

# Danksagung

Mein Dank gilt:

Frau Prof. Dr. R. Koenig für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. R. Hehl und Herrn Prof. Dr. E. Maiß für die spontane Bereitschaft zur Übernahme der Referate und dem Interesse an dieser Arbeit,

Frau Brigitte Quast für die exzellente Zusammenarbeit und ihr tatkräftiges Engagement, das maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat,

meinen Kolleginnen und Kollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die hilfreichen Tips und Anregungen sowie die stete Hilfsbereitschaft,

Herrn Dr. D.-E. Lesemann und seiner Arbeitsgruppe für die geduldige Einführung in die Kunst der Elektronenmikroskopie und die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen,

meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund Hubert Manske, die immer ein offenes Ohr für alle kleinen und großen Sorgen hatten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.